UNTERSUCHUNGEN ZUR EISEN-VERSORGUNG VON **ESCHERICHIA COLI** MIT ENTEROCHELIN-ANALOGEN UND ZUR ANTIGENITÄT VON DIHYDROXYBENZOYL- UND AEROBACTIN-POLY-L-LYSIN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
SIBYLLE HEIDINGER
aus Karlsruhe

1983

83 334

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547620_0052

UNTERSUCHUNGEN ZUR EISEN-VERSORGUNG VON **ESCHERICHIA COLI** MIT ENTEROCHELIN-ANALOGEN UND ZUR ANTIGENITÄT VON DIHYDROXYBENZOYL- UND AEROBACTIN-POLY-L-LYSIN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
SIBYLLE HEIDINGER
aus Karlsruhe

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 1983

Dekan : Prof. Dr. K. P. Hadeler

1. Berichterstatter : Prof. Dr. V. Braun

2. Berichterstatter : Priv. Doz. Dr. K. Hantke

Meinen Eltern

Dr. Irmgard und Gerhard Heidinger

gewidmet

Optik! Optik! Wenn ihr euren ganzen "heutigen" Geist nur einmal von oben sehen könntet. Eure Wissenschaft, eure Kunst, euer tägliches Leben! Nicht um dies alles gering schätzen, o nein, nichts weniger als gering, sondern um es richtig schätzen zu lernen. Eine Menschheit, die zu sich selbst und ihrem Treiben noch keine wirkliche Distanz gewonnen hat, ist unreif, so erwachsen sie sich sonst auch gebärden mag.

Christian Morgenstern

Ewiges Einerlei
was längst beantwortet ist
oder längst zu beantworten wäre,
das wird noch immer gefragt,
das frißt noch immer Gehirn.

Wer alles ernst nimmt, was Menschen sagen,
darf sich nicht über Menschen beklagen.
Alles Reden ist meist nur Gered.
Weiß man erst, was dahinter steht,
läßt man's klappern wie die Mühlen am Bach
und geht stillfein in sein Gemach.

Christian Morgenstern

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Professor Dr. V. Braun am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. V. Braun möchte ich für die Überlassung des Themas, die wichtigen Anregungen und großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Herrn Professor Dr. G. Jung danke ich für die Gastfreundschaft und die großzügige Unterstützung bei der Synthese der Antigene.

Bei Herrn Dr. Wolfgang Rollinger, der die meisten Zeichnungen anfertigte, möchte ich mich besonders für die anregende, tatkräftige und geduldige Begleitung auf so mancher Durststrecke bedanken.

Mein weiterer Dank gilt V.L. Pecoraro und K.N. Raymond für die Bereitstellung der Enterochelin-Analogen, ohne die ein Teil dieser Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre,
Herrn Dr. K. Hantke für die hilfreichen Gespräche und die Bereitstellung von Colicin B,
Herrn Dr. G. Bovermann für die Hilfe bei der Interpretation der Spektren,
Herrn Professor Dr. W. Bessler für die Immunisierung der Kaninchen,
den Mitarbeitern der Mikrobiologie für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft,
meinen Laborkollegen Roy Gross, Klaus Günthner und Rudi Schneider in der Mikrobiologie und meinen Laborkollegen Dr. G. Bovermann, Armin Kern und Herribert Schmitt in der Chemie für die gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1.	Material	16
2.1.1.	Chemikalien	16
2.1.2.	Nährmedien	17
2.1.3.	Bakterienstämme	19
2.2.	Methoden	20
2.2.1.	Charakterisierung der Stämme	20
2.2.2.	Wirkungen der Modellsubstanzen auf das Wachstum von Bakterien	20
2.2.3.	Eisentransportstudien	21
2.2.4.	Konkurrenz der Modellsubstanzen mit Colicin B um den Rezeptor	22
2.2.5.	Antigensynthese	23
2.2.5.1.	Chromatographiesysteme und Detektion	23
2.2.5.2.	Synthese von DHB-Poly-L-Lysin	24
2.2.5.3.	Synthese von Aerobactin-Poly-L-Lysin	26
2.2.6.	Immunisierung	27
2.2.7.	Serengewinnung	28
2.2.8.	Abtrennung der Antikörper vom Serum	28
2.2.9.	Proteinbestimmung	29
2.2.10.	Immunologische Methoden	29
2.2.10.1.	Immundiffusion nach Ouchterlony	29
2.2.10.2.	ELISA	30
2.2.11.	Wachstum von *E. coli* H646 unter dem Einfluß von Antikörpern und Eisen-Mangelbedingungen	31
3.	ERGEBNISSE	34
3.1.	Eigenschaften Enterochelin-Analogen in Bezug auf den Eisentransport bei *Escherichia coli*	34
3.1.1.	Wirkung der Enterochelin-Analogen auf das Wachstum von *E. coli* K-12-Stämmen	34

Seite

3.1.2. Eisentransportstudien mit den Modellsubstanzen 37

3.1.3. Hemmung der Colicin B-Wirkung durch die Enterochelin-Analogen 39

3.2. Herstellung der Antigene DHB- bzw. Aerobactin-Poly-L-Lysin und Untersuchungen zu ihrer Eignung als Antigene 41

3.2.1. Antigensynthese 42

3.2.1.1. Synthese von DHB-Poly-L-Lysin 42

3.2.1.2. Synthese von Aerobactin-Poly-L-Lysin 48

3.2.2. Immunisierung 48

3.2.3. Immunologische Methoden 50

3.2.3.1. Immundiffusion nach Ouchterlony 50

3.2.3.2. ELISA 51

3.2.4. Wachstum des Stammes H646 unter dem Einfluß von Eisenmangel in Gegenwart von Antikörpern 58

4. DISKUSSION 61

5. ZUSAMMENFASSUNG 66

6. LITERATUR 68

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
deion.	deionisiert
dest. deion.	destilliert, deionisiert
DHB	2,3-Dihydroxybenzoesäure
DMB	2,3-Dimethoxybenzoesäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E_{405}	Extinktion bei 405 nm
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Ig	Immunglobulin
k	1000
min	Minute
NMR-Spektrum	Kernmagnetisches Resonanz-Spektrum
OD_{578}	optische Dichte bei 578 nm
rpm	rounds per minute
Std.	Stunde
TDM	4,4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethan
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan
V	Volt

1. EINLEITUNG

Eisen ist für alle Mikroorganismen, ausgenommen die Milchsäurebakterien, ein lebenswichtiges Element. Es spielt bei den Elektronentransportwegen, an denen z.B. Cytochrome und Eisenschwefelproteine beteiligt sind, und in vielen Enzymen, z.B. der Aconitase, eine bedeutungsvolle Rolle. Unter aeroben Bedingungen liegt Eisen in wässrigem Milieu vorwiegend als schwerlösliches Eisen(III)-Hydroxyd-Polymer vor, das eine Dissoziationskonstante von 10^{-38} Mol/l besitzt. Bei pH 7 erreicht die Konzentration des dreiwertigen Eisenions nur 10^{-18} Mol/l. Bakterien benötigen jedoch, um wachsen zu können, eine Eisenkonzentration von 0,1 - 1 µMol/l. Um sich unter Eisenmangelbedingungen ausreichend versorgen zu können, haben Bakterien die Fähigkeit entwickelt, hochaffine Eisenchelatoren zu synthetisieren und in die Umgebung auszuscheiden, die das Eisen in lösliche Form überführen. Die gebildeten Eisenkomplexe werden dann auf spezifischen Wegen aktiv durch die Zellwand der Bakterien geschleust.

Im weiteren werden die bisher bei Escherichia coli gefundenen Eisentransportmechanismen näher erläutert (12,48,66,11).

1. Escherichia coli produziert einen Eisenchelator, der alle bisher gefundenen Chelatoren in der Fähigkeit, Eisen zu komplexieren, weit übertrifft (siehe Tabelle 1). Dieser Chelator wurde Enterochelin bzw. Enterobactin genannt und besteht aus drei Dihydroxybenzoylserin(DBS)-Untereinheiten, die über Esterbindungen ringartig verknüpft sind (siehe Abb. 1). Das Eisen wird im Eisen(III)-Enterochelin-Komplex von den sechs phenolischen Hydroxylgruppen oktaedrisch umgeben. Die Bakterienzelle investiert sehr viel Energie in diesen Chelator. Es sind mindestens sieben Synthesegene (ent-Gene) nötig, um Enterochelin herzustellen. Der Syntheseweg führt von der Chorisminsäure, einer Zwischenstufe in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren, zur Dihydroxybenzoesäure. Unter ATP-Verbrauch wird

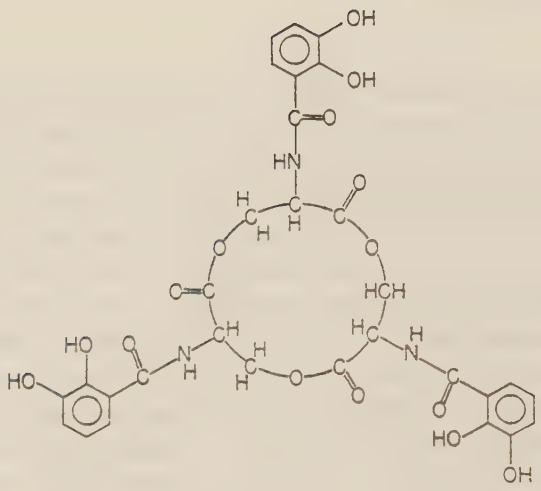


Abb. 1: Struktur von Enterochelin, bestehend aus drei 2,3-Dihydroxybenzoylserinmolekülen, die über Esterbrücken ringförmig verknüpft sind.

aus Dihydroxybenzoesäure und Serin Enterochelin gebildet. Nachdem Enterochelin die Zelle verlassen und Eisen(III) komplexiert hat, bindet der Eisenkomplex an ein spezifisches Rezeptorprotein, das fepA-Gen-Produkt, in der äußeren Membran (44). Das fepA-Genprodukt dient nicht nur Enterochelin, sondern auch Colicin B als Rezeptor (52,62). Durch Enterochelin kann die Bindung von Colicin B verhindert werden (25,26,42). Nach Durchtritt durch die äußere Membran muß als weitere Barriere auf dem Weg ins Zellinnere die Cytoplasmamembran überwunden werden. Das gelingt mit Hilfe des fepB-Gen-Produktes (92), wahrscheinlich einer Permease in der Cytoplasmamembran. Verschiedene Möglichkeiten wären denkbar, auf welche Weise die Zelle das Eisen aus hochaffinen Komplexen herauslöst. Zum Beispiel kann sie das Eisen reduzieren, das dann als Eisen(II) schwächer komplexiert wird, oder sie kann auch das Chelatormolekül zerstören. Die in der Zelle vorliegenden Re-

duktionsmittel sind nicht in der Lage, das Eisen(III)-Enterochelin zu reduzieren (63), das extrapoliert auf pH 7 ein Redoxpotential von -750 mV, gemessen gegen die Normalwasserstoffelektrode, besitzt (2). So muß die Zerstörung des Chelators in Kauf genommen werden. Das Eisen-(III)-Enterochelin wird mit Hilfe der Eisen(III)-Enterochelin-Esterase, dem fesB-Gen-Produkt, gespalten (22). Die Spaltprodukte (im Endeffekt DBS) sind nicht für eine Neusynthese von Enterochelin verwendbar und werden von der Zelle abgegeben (siehe Abb. 2).

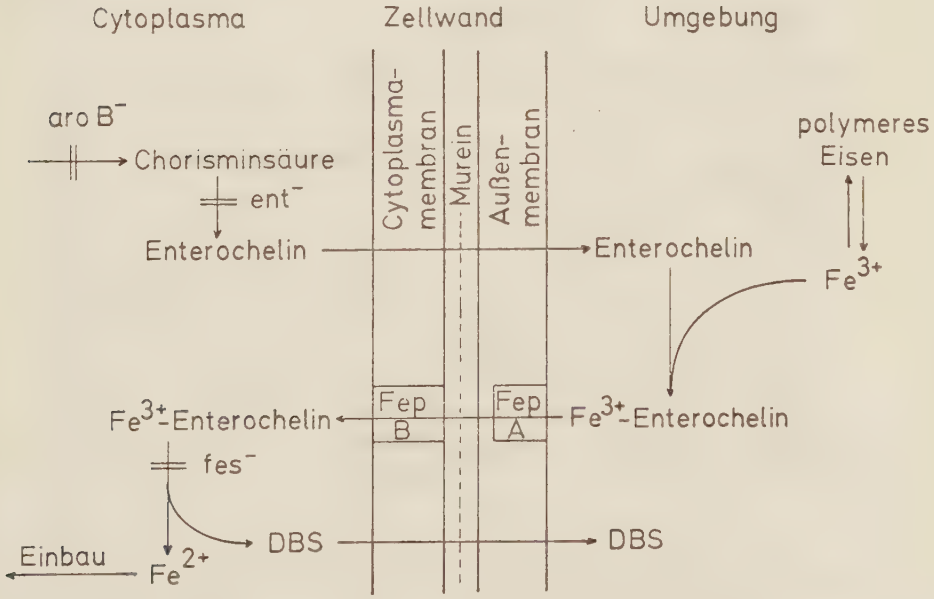


Abb. 2: Schema des Enterochelin-Eisen-Transportsystems. Die Blockaden, die durch die jeweiligen Mutationen hervorgerufen werden, sind eingezeichnet (66).

Ist die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren gestört, z.B. durch Mutation im aroB-Gen (Dehydrochinasäure-Synthetase), kann die Zelle mit Hilfe von DHB mit Eisen versorgt werden (29). Sie synthetisiert aus DHB Enterochelin

und dieses durchläuft die oben dargelegten Prozesse. Erstaunlicherweise ist bei niedrigen DHB-Konzentrationen das FepA-Protein nicht notwendig. Man erklärt sich dies damit, daß das Eisen als DHB-gebundenes Eisen durch die äußere Membran gelangen kann und dann von Enterochelin durch die innere Membran transportiert wird (siehe Abb. 3). Wird zu viel Enterochelin produziert und in die Umgebung abgegeben, fängt dies das Eisen weg und kann nicht aufgenommen werden, weil dabei nicht auf die FepA-Funktion verzichtet werden kann.

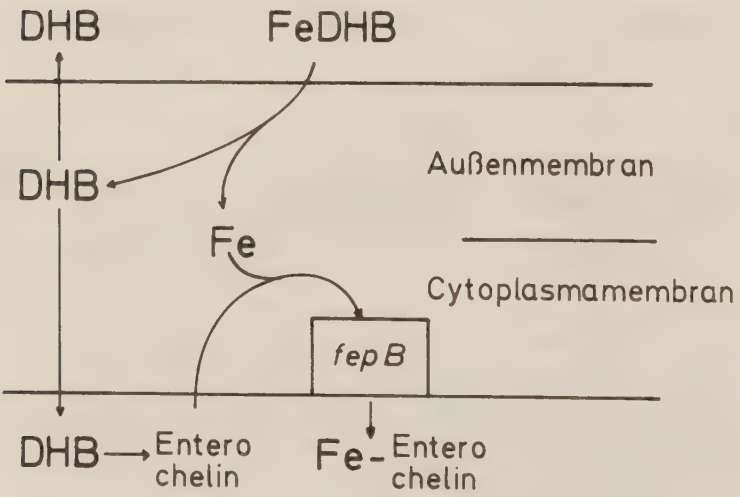


Abb. 3: Möglicher Mechanismus für den Eisentransport durch DHB, wenn kein Rezeptor (FepA) in der äußeren Membran vorhanden ist (29).

2. Ein weiteres Eisentransportsystem kann unter Eisenmangel von E. coli in Gegenwart von Citrat ausgeprägt werden (19). Für die Induktion ist Citrat und Eisen notwendig, wobei der Eisencitrat-Komplex nicht in das Zellinnere gelangen muß (43). Mindestens zwei Gene sind am Citrat-abhängigen Eisentransport beteiligt, das fecA- und das fecB-

Gen. Das fecA-Genprodukt taucht bei Induktion in der äußeren Membran verstärkt auf (27) und bindet Eisencitrat. Mutanten im fecB-Gen können noch Eisencitrat binden, sind aber nicht mehr in der Lage, über diesen Weg Eisen aufzunehmen (76). Da mehr Eisen als Citrat bei diesem Transportmechanismus aufgenommen wird, wird das Eisen eventuell schon in der Membran freigesetzt.

3. Zusätzlich besitzt E. coli ein Transportsystem für den Eisenchelator Ferrichrom. Ferrichrom gehört zu den Chelatoren vom Hydroxamattyp (56) und ist ein zyklisches Hexapeptid, bestehend aus drei Glycin- und drei N_{γ}-Acetyl-N_{γ}-Hydroxyl-Ornithinmolekülen. Er wird nicht von E. coli selbst, sondern von einigen Pilzen produziert. In ihm ist das Eisen über drei N-Acetyl-N-Hydroxyl-Gruppen komplexiert. Mindestens zwei Genprodukte, FhuA und FhuB, ermöglichen den Ferrichrom-Transport (45,91). Das FhuA-Protein fungiert als Rezeptor für Ferrichrom in der äußeren Membran. Fehlt dieses Protein, sind die Zellen resistent gegen Colicin M, die Phagen T1, T5 und ϕ80 und gegen das Antibiotikum Albomycin (13,33,41,78). Man nimmt an, daß sich das fhuB-Gen-Produkt in der Cytoplasmamembran befindet (91). Das Eisen wird im Falle des Ferrichroms durch Reduktion freigesetzt und die Affinität des Chelators gegenüber Eisen(III) durch Acetylierung herabgesetzt (40). Die Reduktion und Modifikation sind membrangebundene Prozesse (68), so daß auch bei diesem Weg Eisen eventuell schon in der Cytoplasmamembran aus dem Komplex gelöst wird.

4. In Col V-Plasmid tragenden, virulenten E. coli-Stämmen wurde ein weiteres Eisentransportsystem gefunden, das als ein Faktor bei der Virulenz von Bedeutung ist (71,87, 88). Das Plasmid trägt Synthesegene für das Aerobactin (7,77). Aerobactin gehört ebenfalls zu den Hydroxamat-Eisen-Chelatoren und besteht aus zwei N-Hydroxyl-N-Acetyl-Lysin-Resten und einem Citratanteil (siehe Abb. 4). Das Eisen wird in Aerobactin wahrscheinlich über die beiden

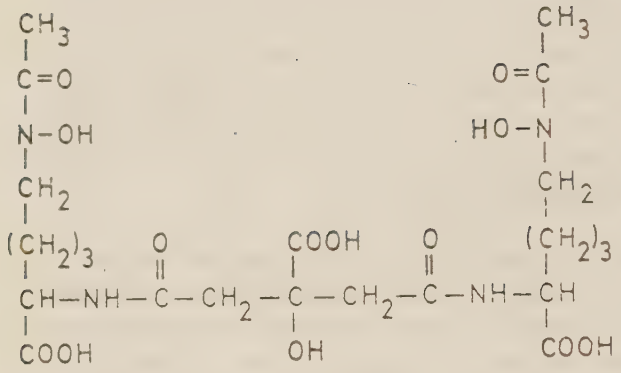


Abb. 4: Struktur von Aerobactin

N-Hydroxyl-N-Acetyl-Gruppen und die zentrale Carboxyl- und die Hydroxyl-Funktion des Citrats komplexiert (37). Außer für die Synthese des Chelators ist das Plasmid auch für die Ausprägung des Aerobactinrezeptors in der äußeren Membran verantwortlich. An diesem Rezeptor bindet auch Cloacin, ein Bacteriocin von Enterobacter cloacae (3,23, 73). Zusätzlich zu den Genen auf dem Plasmid sind chromosomale Gene des Ferrichromtransportweges beteiligt (9).

Allen erwähnten Transportsystemen ist gemeinsam, daß sie tonB-abhängig sind. Das tonB-Genprodukt wird dabei verbraucht und muß ständig neu synthetisiert werden (46). Vieles unterstützt die Hypothese, daß das tonB-Gen-Produkt durch die Übertragung der Energie vom energetisierten Zustand der Cytoplasmamembran auf die Rezeptoren in der äußeren Membran deren Funktion beeinflußt (10,28,34,64,79). Somit ist erklärlich, daß bei Eisenversorgung mittels geringer DHB-Konzentration auf die tonB-Funktion verzichtet werden kann, da ja kein Rezeptor der äußeren Membran beteiligt ist (29). Andere Daten sprechen dafür, daß die tonB-Funktion auf die Cytoplasmamembran einwirkt (90,92). Eventuell spielt tonB bei den verschiedenen tonB-abhängigen Transportwegen eine unterschiedliche Rolle.

Als weiteres chromosomales Gen ist das exbB-Gen am Eisentransport beteiligt. Durch Mutation des exbB-Gens wird der Ferrichrom- und Aerobactintransport verhindert und die Aufnahme von Enterochelin, Eisencitrat und Eisen-DHB reduziert (9,35,61).

Ist genügend Eisen in der Umgebung, so gelangt es durch ein niedrig affines System in die Zelle.

Erst unter Eisenmangelbedingungen werden die spezifischen Eisentransportsysteme ausgebildet.

Zusätzlich zu den Rezeptorproteinen FhuA, FepA und FecA (in Gegenwart von Citrat) treten bei Eisenmangel als weitere Proteine das cir-Gen-Produkt und das 76K- und das 83K-Protein in der äußeren Membran auf (80). Für die zuletzt genannten Proteine konnte noch keine Eisentransportfunktion nachgewiesen werden; das cir-Gen-Produkt bindet Colicin I (48). In Gegenwart eines Col V-Plasmids wird unter Eisenmangel verstärkt der Aerobactinrezeptor ausgeprägt (8). In Abb. 5 wird ein Überblick über die Eisentransportfunktionen in der inneren und äußeren Membran gegeben.

Die Induktion dieser Proteine läßt sich durch Insertion des Phagen Mu (Ap, lac) in diese Gene quantitativ erfassen, da die Bildung von β-Galaktosidase auf diese Weise unter die Kontrolle des Eisengehalts der Zelle gerät. Es zeigt sich, daß die Gene bei hoher Eisenkonzentration reprimiert sind und das fhuA-Gen bei höherer Eisenkonzentration dereprimiert wird als das fepA- und cir-Gen, aber die Steigerung der FhuA-Produktion geringer ist als die von FepA und vom cir-Gen-Produkt. Mutanten, die auch in eisenreichem Medium die Rezeptor-Proteine in der äußeren Membran ausprägen, werden fur (ferric iron uptake regulation)-Mutanten genannt. Das FecA wird schon bei 10 µM Citrat (im Gegensatz dazu beim Wildtyp erst bei 100 µM) voll induziert. Nur beim FepA-Protein scheint noch ein weiterer Regulationsmechanismus zu bestehen, da es in der fur-Mutante nicht voll induziert ist, wenngleich es schon verstärkt ausgeprägt wird (31).

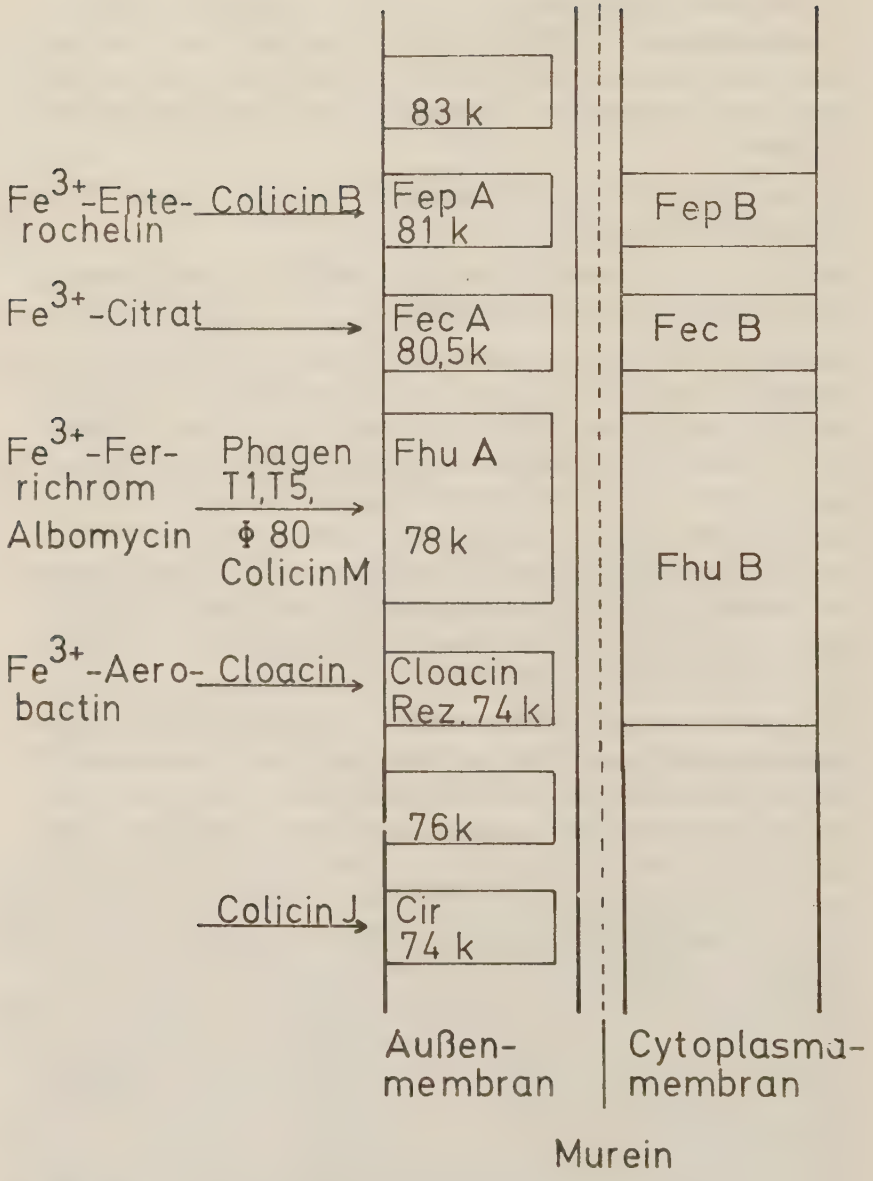


Abb. 5: Übersicht über die Eisentransportfunktionen der äußeren und inneren Membran bei E. coli-Stämmen. In Klammer sind die Molekulargewichte angegeben, wie sie sich bei Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat ergeben.

Bringt man das intakte fur-Gen mittels eines Plasmids in eine fur-Mutante, so dominiert dieses Gen über das mutierte chromosomale Gen und die Transkription der Eisentransportgene wird wieder eisenabhängig. Das läßt sich mit einem negativen Eisen-Kontrollmechanismus erklären, d.h. das fur-Gen codiert für einen Repressor, der bei hoher Eisenkonzentration die Transkription der Eisentransportgene verhindert. In der fur-Mutante ist der Repressor auch bei ausreichender intrazellulärer Eisenkonzentration inaktiv (30).

Aus der Vielzahl der Eisentransportsysteme läßt sich auf die große Bedeutung ausreichender Eisenversorgung schließen. Neben der Fähigkeit, sich an Schleimhäute anheften und durch diese eindringen zu können, gegen Phagocytose gefeit und durch Toxinbildung den Organismus zu schädigen (15,70), stellt der Besitz eines hochaffinen Eisentransportsystems bei Krankheitserregern unbestritten einen wichtigen Virulenzfaktor dar (17,24,87,93). Wird Versuchstieren gleichzeitig mit den Krankheitskeimen Eisen oder ein von diesen Keimen verwendbarer Eisenchelator verabreicht, so reichen sehr viel weniger Bakterien aus, Krankheit und Tod herbeizuführen (65, 80,81). Auch sind Menschen mit erhöhtem Plasmaeisenspiegel anfällig gegenüber Infektionen. Zu erhöhtem Eisenspiegel kann es z.B. durch Leberentzündungen und hämolytische Krankheiten kommen.

Infektionen finden normalerweise über die Schleimhäute statt. Manche Bakterien setzen sich dort fest, andere dringen weiter ein. Bereits an den Schleimhäuten treffen die Bakterien auf Abwehrmechanismen des angegriffenen Organismus. Erwähnt seien die Sekretion von s-IgA, das die Anheftung von Bakterien verhindern und Toxin neutralisieren kann. Zusätzlich wird Schleim produziert, der ständig in eine Richtung bewegt wird und damit auf physikalischem Wege die Anlagerung der Bakterien erschwert. In den meisten sekretorischen Flüssigkeiten findet man auch Lysozym, ein Enzym, das zur Lyse von Bakterien führen kann, und auch ein System, das mit Wasserstoffperoxid die Bakterien abtötet (53). Bereits an den Schleimhäuten müssen die Bakterien um das Eisen mit dem Lac-

toferrin, einem eisenbindenden Protein, konkurrieren. An den Infektionsstellen wird zusätzliches eisenfreies Lactoferrin aus den sekundären Granula von Leukozyten, die an die Infektionsstelle heranwandern, freigesetzt (81).

Im Blut treffen die Bakterien auf das Transferrin. Transferrin hält das Eisen für den Organismus in Lösung und dient als Transportmittel. Zusätzlich wirkt es bakteriostatisch, da es bei einem Eisengehalt des menschlichen Plasmas von etwa 20 µMol pro Liter die Eisen(III)ionenkonzentration um Größenordnungen unterhalb der Anforderungen von Bakterien hält. Das wird durch seine starke Eisenbindungsfähigkeit (siehe Tabelle 1) und seinen geringen Sättigungsgrad von 25 - 30 % in normalem menschlichem Blut bewirkt (6,24,81). Bakterien vermehren sich also im Blut nur, wenn sie dem Transferrin mit Hilfe von hochaffinen Eisenchelatoren Eisen entziehen können. Enterochelin ist dazu in der Lage (93).

Bei Infektion setzt der angegriffene Organismus die Bakterien noch stärker unter Eisenmangel, indem er geringere Mengen an Eisen aus dem Darm aufnimmt und vermehrt in Form von Ferritin speichert. Daran ist eventuell Lactoferrin beteiligt, das bei Infektion auch im Blut von Leukozyten freigesetzt wird und dann Eisen von Transferrin abzieht (67). Wegen seiner geringen Halbwertszeit bewirkt es eine Verschiebung des Eisens in die Speicher. Mit intravenöser Injektion von Lactoferrin konnte diese Verschiebung ebenfalls erreicht werden (81).

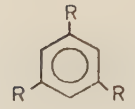
Neben der Erniedrigung der Eisenkonzentration gibt es auch Mechanismen, die die Eisenaufnahme der Bakterien behindern. Bei höherer Temperatur (Fieber) wird die Synthese von Enterochelin gehemmt (21,87). Zusätzlich erhöhen Antikörper die bakteriostatische Wirkung von Transferrin (18,20,55). Antikörper gegen Lipopolysaccharid, einem Bestandteil der Zellwand von Bakterien, scheinen die Freisetzung von Enterochelin zu verhindern. Der Transport von Enterochelin bleibt dabei unbeeinflußt (18). Andererseits existieren in normalem menschlichem Serum Antikörper der IgA-Klasse, die Enteroche-

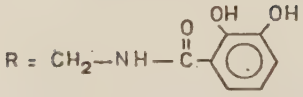
lin binden und damit das Enterochelin-Eisentransportsystem lahmlegen (54,55).

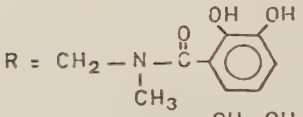
Wenn der menschliche Körper mit Eisen überfrachtet ist, z.B. infolge von akuten Vergiftungen oder bedingt durch häufige Bluttransfusionen, können die genannten Abwehrmechanismen, abgesehen von anderen Schäden, nicht zum Tragen kommen. Bei der Behandlung dieser Eisenüberladung wird ein natürlich vorkommender Eisenchelator, Desferrioxamin B, eingesetzt. Er gehört zu den Eisenchelatoren vom Hydroxamattyp (56). Die Chelatoren vom Hydroxamattyp haben den Nachteil, daß sie, auch wenn sie thermodynamisch sehr gut in der Lage sind, aus kinetischen Gründen nur sehr langsam Eisen vom Transferrin abziehen (siehe Tabelle 1 und 2 unter Ferrioxamin B) (60). Die Eisenchelatoren vom Phenolattyp besitzen die kinetische Barriere nicht. Jedoch hat Enterochelin, der stärkste Eisenchelator überhaupt (siehe Tabelle 1), andere Nachteile. Es ist schwer wasserlöslich, leicht hydrolytisch spaltbar und außerdem sehr oxidationsempfindlich. Auf der Suche nach geeigneten Eisenchelatoren zur Behandlung von Eisenüberladung wurden Enterochelin-Analoge synthetisiert (siehe einige in Abb. 6, Tabelle 1 und 2).

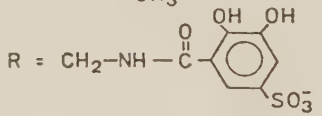
Bei der Verwendung dieser Substanzen in der Medizin ist natürlich von Bedeutung, inwieweit diese Enterochelin-Analogen von Bakterien verwendet werden können. Welcher Teil des Enterochelinmoleküls ist für die Bindung an den Enterochelinrezeptor verantwortlich? Es wurde bereits gezeigt, daß die räumliche Anordnung um das Eisen eine wichtige Rolle spielt (57). Mit der Modellsubstanz MECAM kann die Bedeutung des Ringsystems für die Erkennung untersucht werden. MECAM (1,3,5-N,N',N''-tris-(2,3-Dihydroxybenzoyl)-Triaminomethylbenzol) (39,74,83) ist Enterochelin am ähnlichsten (siehe Abb. 7). Es besitzt an Stelle des Esterringsystems einen aromatischen Ring und ist damit durch Esterasen nicht angreifbar.

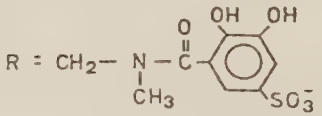
In Me_3MECAM sind zusätzlich die Amidbindungen methyliert (60). TRIMCAM (1,3,5-tris-(2,3-Dihydroxybenzoylcarbamido)-benzol

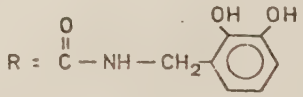


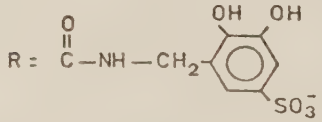
MECAM R = 

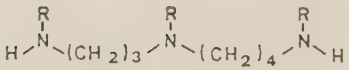
Me_3 MECAM R = 

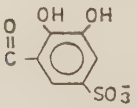
MECAMS R = 

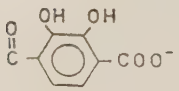
Me_3 MECAMS R = 

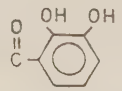
TRIMCAM R = 

TRIMCAMS R = 



3,4 LICAMS R = 

3,4 LICAMC R = 

Diisp.-3,4 LICAM R = 

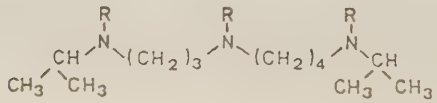


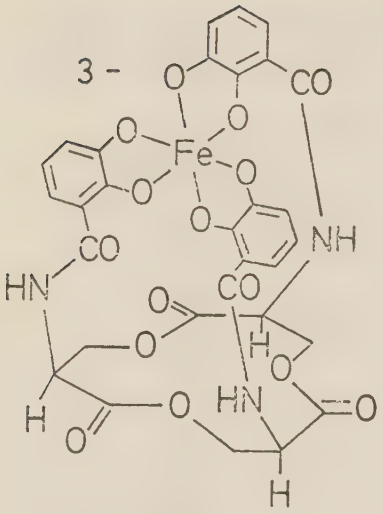
Tabelle 1: Freie Eisen(III)ionen-Konzentration, ausgedrückt als pM = -log $[Fe^{3+}]$, berechnet für eine Gesamt-Ligandenkonzentration von 10^{-5} M und einer Gesamt-Eisenkonzentration von 10^{-6} M bei einem pH von 7,4

Ligand	pM	Referenzen
Enterochelin	35,5	(36)
MECAMS	29,4	(38)
MECAM	29,1	(36)
3,4-LICAMS	28,5	(38)
Me_3MECAMS	26,9	(60)
Ferrioxamin B	26,6	(63)
Ferrichrom	25,2	(36)
TRIMCAMS	25,1	(38)
Transferrin	23,6	(63)
Aerobactin	23,3	(37)

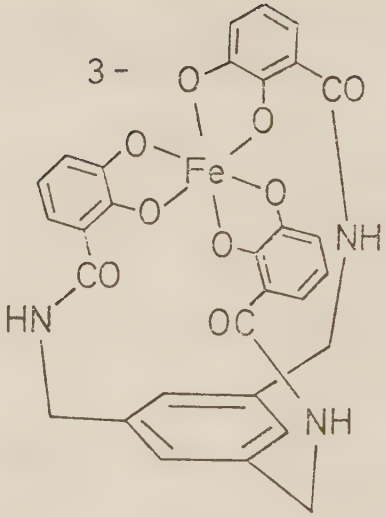
Tabelle 2: Fähigkeit der Liganden, Eisen von Transferrin abzuziehen (60). Angegeben wird der Anteil an Eisen, der in 30 min von Transferrin (mindestens zu 95 % an Eisen gesättigt) abgegeben wird, wobei das Verhältnis von Ligand zu Transferrin eine entscheidende Rolle spielt

Ligand	% Eisen von Transferrin nach 30 min abgegeben	Verhältnis Ligand zu Transferrin
Enterochelin	6	1:1
MECAM	13	1:1
3,4-LICAMS	6	1:1
	50	40:1
Me_3MECAMS	4	7:1
3,4-LICAMC	6	7:1
Desferrioxamin B	5	100:1

Abb. 6: Übersicht über die Strukturen der verwendeten Enterochelinanalogen.



Enterochelin



MECAM

Abb. 7: Vergleich der Strukturen von Enterochelin und MECAM. MECAM unterscheidet sich von Enterochelin durch den Ersatz des 12-gliedrigen Rings durch das ebene 1,3,5-Trimethylen-Benzol-Ringsystem.

(38) ist ein Strukturisomeres von MECAM. Es unterscheidet sich von MECAM durch den Austausch der Methylen- und Carbonylfunktionen, wodurch die Elektronenverteilung im Molekül verändert ist. Die sulfonierten Derivate MECAMS (82), Me_3MECAMS (60) und TRIMCAMS (82) sind stärker geladen und besitzen eine höhere Spannung. Den Analogen 3,4-LICAMS (1,5,10-N,N',N''-tris-(5-sulfo-2,3-Dihydroxybenzoyl)-Triazadecan) (38), Diisp-3,4-LICAM (N,N''-Diisopropyl-N,N',N''-tris-(2,3-Dihydroxybenzoyl)-1,5,10-Triazadecan) (84) und 3,4-LICAMC (N,N',N''-tris-(2,3-Dihydroxy-4-Carboxybenzoyl)-1,5,10-Triazadecan) (85) fehlen die Ringstruktur. In 3,4-LICAMC sind die 2,3-Dihydroxybenzoylringe in 4-Stellung carboxyliert, wohingegen 3,4-LICAMS in 5-Stellung Sulfongruppen trägt. Im Diisp-3,4-LICAM sind zwei der drei Stickstoffatome durch Isopropyl-Gruppen blockiert.

Ziel der Arbeit

Es sollte untersucht werden, ob die verfügbaren Modellsubstanzen das Wachstum von Bakterien fördern und auf welchem Wege sie eventuell aufgenommen werden. Außerdem sollte versucht werden, Antikörper zu gewinnen, die mit Enterochelin bzw. Aerobactin kreuzreagieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Amersham	$^{55}FeCl_3$ in 0,1 n HCl (1,18 mCi/ml, 275 µg Fe/ml)
Behring	Freund'sches Adjuvans
Bio-Rad	Biogel P-4, Chelex 100
Difco	Bacto Agar, Bacto Trypton, Yeast Extract
EGA	2,3-Dimethoxybenzoesäure
Fluka, Buchs	2,3-Dihydroxybenzoesäure, N-Aethyl-N'-3-dimethylaminopropylcarbodiimid-hydrochlorid
Hoffmann La Roche	Fluram (Fluorescamin)
Miles	Alkaline Phosphatase-Anti-Rabbit IgG (Goat)
Pharmacia	Sephadex G-15
Roth	Tween 80
Seakem, Corporation Marine Colloids	Agarose
Serva	TRITON X-100, Chlorhexidin, Alu Gel S
Sigma	p-Nitrophenyl-phosphat, Poly-L-Lysin x HBr (Typ I-B), Rinderserumalbumin, Dilysin-Dihydrochlorid, Dinatrium-Succinat
Zinsser	Polyvials 714, Quickszint 402

Die Enterochelin-Analogen wurden von V.L. Pecoraro und K.N. Raymond, Aerobactin als Vergleichssubstanz von V. Braun, vorgereinigtes Aerobactin von H. Wolff und Colicin B von K. Hantke zur Verfügung gestellt.
Alle übrigen Chemikalien wurden analysenrein von Merck, Darmstadt, bezogen.

2.1.2. Nährmedien

Minimalsalze

M9-Salze: 10fach konzentriert

$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	75,2 g
KH_2PO_4	30 g
NaCl	5 g
NH_4Cl	10 g

in 1 l dest. deion. Wasser gelöst

M63-Salze: 10fach konzentriert

KH_2PO_4	13,6 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g

in 100 ml dest. deion. Wasser gelöst, mit KOH pH 7 eingestellt.

Nährmedien

TY-Medium:

8 g Bacto Trypton
5 g Yeast Extract
5 g NaCl
in 1 l deion. Wasser gelöst

Minimalmedium M631:

50 ml Na_2-Succinat x 6 H_2O (0,6 M)
100 ml M63-Salze (10fach konzentriert)
100 ml Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin (je 1 mg/ml)
20 ml para-Hydroxybenzoesäure, para-Aminobenzoesäure (je 10 mM)
1 ml Thiamin (1 mg/ml)
1 ml $MgSO_4$ (1 M)
10 µl Na_3Citrat x 2 H_2O (1 M)
5 ml Prolin (10 mg/ml)
ad 1 l mit dest. deion. Wasser

Minimalmedium für die Eisen-Transportstudien:

100	ml	M9-Salze
10	ml	Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin (je 1 mg/ml)
2	ml	para-Hydroxybenzoesäure, para-Aminobenzoesäure (je 10 mM)
2	ml	Glucose (20 %)
1	ml	Thiamin (1 mg/ml)
0,1	ml	$MgSO_4$ (1 M)
0,1	ml	$CaCl_2$ (0,1 M)

Minimalmedium für den AroB-Test

+ Aromaten		- Aromaten		
10	ml	10	ml	M9-Salze 10fach konzentriert
10	ml	--		Trp, Tyr, Phe (je 1 mg/ml)
2	ml	--		para-Hydroxybenzoesäure, para-Aminobenzoesäure (2 mM)
1	ml	1	ml	Glucose (40 %)
1	ml	1	ml	$Na_3Citrat \times 2\ H_2O$ (1 M)
1	ml	1	ml	Thiamin (1 mg/ml)
0,1	ml	0,1	ml	$MgSO_4$ (1 M)
0,1	ml	0,1	ml	$CaCl_2$ (0,1 M)
90	ml	102	ml	dest. deion. Wasser

Die Bestandteile der Minimalmedien werden in dest. deion. Wasser gelöst und getrennt autoklaviert. Die Tryptophan-, Tyrosin-, Phenylalanin-Lösung und die para-Hydroxybenzoesäure-, para-Aminobenzoesäure-Lösung müssen neu angesetzt werden, wenn sie sich bräunlich verfärben.

Plattenmedium:

Zu den angegebenen Medien wurden 15 g Bacto Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt; für den Weichagar nur 7,5 g.

2.1.3. Bakterienstämme

Escherichia coli K-12

Bezeichnung		Merkmale	Referenzen
AB2847	(86)	aroB thi tsx malT	(29)
IR2O	(188)	wie AB2847, jedoch fepA	(32)
IR2OA	(199)	wie IR2O, jedoch fhuA	
IR2O/111	(298)	wie IR2OA, jedoch cir	
VR42/B9	(183)	wie AB2847, jedoch fepA cir	(29)
BR158	(195)	wie AB2847, jedoch tonB	(32)
WA1O24	(511)	wie AB2847, jedoch fecA14 fepA	(76)
VR42	(191)	wie AB2847, jedoch cir	(32)
H646	(646)	wie AB2847, jedoch rpsL cir ColV-K311	(3)
AN92	(225)	aroB proA argE pheA tyrA try rpsL thi	(89)
AN92/B3	(256)	wie AN92, jedoch fepA	(29)
AN26O	(226)	wie AN92, jedoch fepB	(49)
AN272	(227)	wie AN92, jedoch fesB	(49)
AN299/23	(534)	wie AN92, jedoch fecB fepA	

Die Zahlen in Klammern hinter den Stammbezeichnungen geben die Stamm-Nr. in der Stammsammlung Mikrobiologie II, Tübingen, an.

2.2. Methoden

2.2.1. Charakterisierung der Stämme

Aro B Test

1 ml Übernachtkultur in TY-Medium wurde 10 min bei 4000 rpm (Heraeus Christ, Minifuge) zentrifugiert und die Zellen zweimal mit Saline gewaschen. Danach wurden sie in Saline suspendiert und auf die Aro B-Testplatten (siehe Methoden 2.1.2.) ausgestrichen. Die aroB-Mutanten können nur auf den Platten mit Aromaten wachsen.

Test auf Colicin V-Produktion

Von einer Einzelkolonie des Stammes H646 wurden Bakterien auf eine frische TY-Platte punktförmig überimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Zellen durch Chloroformdampf abgetötet. Die Platte wurde noch 1 Std. offen stehengelassen, um das Chloroform zu entfernen. Danach wurden 100 µl Übernachtkultur des Colicin V-empfindlichen Teststammes (AB2847) mit 3 ml TY-Weichagar über die Platte verteilt. Bildete sich bei Inkubation der Platte bei 37°C ein Hemmhof, so hatte H646 Colicin V produziert.

2.2.2. Wirkungen der Modellsubstanzen auf das Wachstum von Bakterien

10^8 Zellen aus stationärer Kultur wurden in 2,5 ml wässrigem Weichagar bei 42°C vermischt und auf 10 ml M631-Agar aufgebracht. Bei den Bakterienstämmen, die Arginin zum Wachstum benötigen, war soviel Arginin (2 mg/ml) zugefügt, daß eine Endkonzentration in der Platte von 50 µg/ml erreicht wurde. Trockene Filterrondellen mit je 200 nMol eisenhaltiger Modellsubstanz wurden auf den erstarrten Weichagar gelegt und die Platten ein bis zwei Tage bei 37°C inkubiert.

2.2.3. Eisentransportstudien

Bakterienkultur

Zellen vom Bakterienstamm AB2847 wurden in M9-Medium bei 37°C über Nacht vorgezogen. Die Kultur wurde mit M9-Medium auf OD_{578} 0,05 verdünnt, bei 37°C geschüttelt, bis OD_{578} 0,5 erreicht war, die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 4000 rpm, Heraeus Christ, Minifuge) und in M9-Medium so aufgenommen, daß sich eine OD_{578} von 1 ergab.

^{55}Fe-Chelatorlösungen

Me_3MECAM, 3,4-LICAMS und Diisp-3,4-LICAM wurden zu einer Konzentration von 1,2 mMol/l in dest. deion. Wasser gelöst, MECAM und TRIMCAM in DMSO. Die Lösungen wurden erst kurz vor Versuchsbeginn hergestellt.
Die Stammlösung von radioaktivem Eisen enthielt 275 µg Fe/ml entsprechend 1,18 mCi/ml. Eine millimolare Lösung wurde durch Verdünnung mit dest. deion. Wasser hergestellt. Die Chelatorlösung wurde mit gleichem Volumen radioaktiver Eisenlösung versetzt. So standen die Konzentrationen des Chelators zum Eisengehalt im Verhältnis 6:5.

Transportansatz

5 ml M9-Minimalmedium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane wurden mit 100 µl einer 10 millimolaren Nitrilotriacetat-Lösung versetzt, die mit NaOH auf pH 7 eingestellt war. Es wurden 10 µl ^{55}Fe-Chelatorlösung zugegeben und 10 min bei 37°C geschüttelt. Danach wurden 5 ml der Bakterienkultur von OD_{578} 1, die auf Eis stand, zugegeben und innerhalb von 15 - 20 min 6 - 7 Proben à 500 µl entnommen. Als Kontrolle wurde nur 5 ml kaltes M9-Medium zugegeben und 3 Proben innerhalb von 15 min genommen.
Die Zellen der Proben wurden mittels Wasserstrahlpumpe schnell auf LiCl getränkte Cellulose-Nitratfilter (Typ BA85, 0,45 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) abfiltriert und 2 x mit 4 ml 0,1 M LiCl gewaschen. Die Filter mit den Zellen

wurden in Szintillationsgefäße bei 60°C getrocknet. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 402) und Abkühlen wurde 4 min pro Probe mit dem Betaszint BF 5000 (Berthold) gezählt. Die Zählraten wurden nach Abzug der Kontrollwerte mit Hilfe der optischen Dichte der Bakteriensuspensionen auf pMol Eisen pro mg Bakterientrockengewicht umgerechnet (OD_{578} 1 ≙ 0,38 mg Zell-Trockengewicht/ml).

2.2.4. Konkurrenz der Modellsubstanzen mit Colicin B um den Rezeptor

Titerbestimmung der Colicin B-Lösung

Je 2,5 ml TY-Weichagar mit 100 µl Übernachtkultur von AB2847 wurde auf TY-Platten ausgegossen. Die Colicin B-Stammlösung wurde mit TY-Medium in Schritten von 1:10 verdünnt und je 5 µl aufgetropft. Die Verdünnung, die nach Inkubation bei 37°C gerade noch einen klaren Hemmhof zeigte, ergab den Titer der Colicin B-Lösung.

Plattentest zur Konkurrenzbestimmung

5 µl einer 1:10 mit TY-Medium verdünnten Colicin B-Lösung (Titer 10^4) wurden auf TY-Platte aufgetropft, die mit 2,5 ml TY-Weichagar mit 100 µl Übernachtkultur von AB2847 überschichtet war. Die Platten wurden 26 Std. im Kühlschrank gelagert, um Colicin B diffundieren zu lassen, ohne daß Zellwachstum möglich war. Danach wurden im Abstand von 1,3 cm von der Auftragsstelle des Colicins Filterrondellen mit 20 nMol bzw. 200 nMol der eisenhaltigen Chelatoren aufgelegt. Nach 1 Std. bei Raumtemperatur wurde die Platte bei 37°C inkubiert.

Wachstumskurven von AB2847 in Anwesenheit von Colicin B und FeMECAM in Flüssigkultur

Eine Übernachtkultur des Stammes AB2847 wurde auf OD_{578} 0,05 mit TY-Medium verdünnt. Je 5 ml wurden in Erlenmeyer mit einer Schikane und einem Aufsatz gegeben, der es gestattet,

ohne Probennahme die optische Dichte zu messen. Stammlösungen von FeMECAM (1 mM in dest. deion. Wasser) und von Colicin B, mit TY-Medium 1:100 verdünnt, wurden sterilfiltriert. Je zwei Kulturansätze wurden mit 100 µl der gleichen Colicin B-Verdünnung ($1:10^3$, $1:2 \times 10^3$, $1:10^4$) versetzt und zum einen Ansatz 25 µl 1 mM FeMECAM (Endkonzentration 5 µM) und zum anderen als Vergleich 25 µl dest. deion. Wasser zugesetzt. Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 37°C inkubiert und die optische Dichte verfolgt. Zusätzlich wurde eine Wachstumskurve nur mit FeMECAM als Zusatz aufgenommen.

2.2.5. Antigensynthese

2.2.5.1. Chromatographiesysteme und Detektion

Platten

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}, Schichtdicke 0,25 mm (Merck)

Chromatographiesysteme

1) Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 65:25:3:4
2) Methanol/Wasser im Verhältnis 1:1

Detektion

1) Bei der Anregungswellenlänge des Fluoreszenzindikators 254 nm (DESAG Firmengruppe, UVIS-Gerät) erscheint die Platte hell. Befindet sich auf der Platte nach der Chromatographie eine Substanz, die in diesem Bereich absorbiert (aromatische Ringsysteme), kann der Indikator nicht mehr angeregt werden und die Substanz erscheint als dunkler, violetter Fleck. Betrachtet man die Platte bei der Anregungswellenlänge von 366 nm, erkennt man Substanzen, die von sich aus fluoreszieren (z.B. DHB blau).

2) Nach Trocknen der Platte und Betrachtung unter der UV-Lampe wurden sie mit Ninhydrin-Lösung angesprüht und bei 115°C im Trockenschrank entwickelt. Eine Farbreaktion tritt auf, wenn Aminfunktionen vorhanden sind.
Ninhydrin-Lösung: 0,5 g Ninhydrin wurde in 10 ml 1-Butanol unter dem Zusatz von 3 ml Eisessig gelöst.

3) TDM-Reagenz: 4,4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethan (72)
I. 7,5 g TDM wurden in 30 ml Eisessig gelöst, mit 150 ml Wasser verdünnt und filtriert.
II. 15 g KJ wurde in 300 ml Wasser gelöst.
Nach Mischen von I. und II. ist das Reagenz verwendbar und hält unzersetzt einige Wochen bei +5°C.
Nach Ninhydrinfärbung wurde die Platte einige Minuten in einen Exsikkator mit Chlorgas gelegt, um die Verbindungen auf der Platte zu oxidieren. Die Färbung mit Ninhydrin verschwindet dabei. Danach wurde das Chlor von der Platte mit Druckluft weggeblasen und die Platte mit TDM-Reagenz besprüht. Verbindungen, die mindestens ein durch Chlor substituierbares Wasserstoffatom am Stickstoff besitzen, lassen sich gut nachweisen. Auch Phenole oder ähnliche Verbindungen ergeben eine Farbreaktion (z.B. DHB gelblich).

4) Anfärbung mit $FeCl_3$: 1 % Eisen(III)Chlorid, in Wasser gelöst, wurde auf die Platte gesprüht und ergab mit DHB eine Blaufärbung.

2.2.5.2. Synthese von DHB-Poly-L-Lysin

Kupplung von DHB (2,3-Dihydroxybenzoesäure) bzw. DMB (2,3-Dimethoxybenzoesäure) an Poly-L-Lysin x HBr mit Dicyclohexylcarbodiimid (69)

Ansatz: Poly-L-Lysin x HBr wurde in möglichst wenig dest. deion. Wasser (200 µl bis 1 ml) in einem Schnappdeckelgläschen unter Rühren gelöst. Triäthylamin wurde in äquimolaren Mengen bezüglich der ε-Aminfunktion zugesetzt und mit 2 N

HCl ein pH von 7,5 - 8 eingestellt. DHB bzw. DMB wurden in 200 - 500 µl Dimethylformamid (DMF) zugegeben. Das Verhältnis der Carboxylkomponenten zu den Aminfunktionen betrug 1:3. Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) wurde, bezogen auf die Carboxylkomponente, in 50fachem Überschuß, in 500 µl DMF gelöst, beigemischt. DCCI ist allergen.

Aufarbeitung von DMB-Poly-L-Lysin

Die Reaktionsmischung wurde 3 Tage lang stark gerührt (zur Emulsionsbildung). Es bildete sich ein Niederschlag. Die Mischung wurde in Äther gegeben. Die wässrige Phase wurde zentrifugiert, konnte aber nicht ganz vom Niederschlag (vorwiegend Dicyclohexylharnstoff) getrennt werden. Sie wurde mehrfach mit Äther bei pH 4 (eingestellt mit 1 N Essigsäure) und pH 8 (eingestellt mit verdünntem Ammoniak) extrahiert, um überschüssiges DMB und den Dicyclohexylharnstoff zu entfernen. Nach Einstellen von pH 7 wurde die Mischung mehrfach lyophilisiert, um Triäthylamin und Ammoniumacetet zu beseitigen. Da das nicht ausreichte, wurde noch 2 Tage gegen dest. deion. Wasser dialysiert (Dialyseschlauch, Spectrapor, Ausschlußgrenze 6000 - 8000, Reichelt, Chemie, Technik) und erneut lyophilisiert.

Vorbereitung der Probe zur Protonenresonanzspektroskopie

8 mg Lyophilisat lösten sich gut in 500 µl dest. deion. Wasser. Die Lösung wurde filtriert, um unlösliche Partikel zu entfernen, lyophilisiert, in 1 ml deuteriertem Wasser gelöst und ein Protonenresonanzspektrum aufgenommen.

Ätherspaltung mit HBr/Eisessig (4)

Die 40 % (w/w) HBr/Eisessig-Mischung wurde zur Entfernung von Brom mit einer Spatelspitze 2,3-Dihydroxybenzoesäure versetzt und am Licht 10 Minuten gerührt (Kölbchen mit Trockenrohr). Durch die Lichteinwirkung entstehen aus Brom Bromradikale, die durch DHB abgefangen werden.

DMB-Poly-L-Lysin wurde über Nacht über Phosphorpentoxyd im Hochvakuum (Exsikkator, Ölpumpe) getrocknet, dann mit der DHB/HBr/Eisessig-Mischung versetzt und 2 Stunden im Paraffinbad bei 40°C im Dunkeln (Kölbchen in Alufolie eingewikkelt, versehen mit Trockenrohr) gerührt. Nach 1 Stunde wurde nochmals DHB/HBr/Eisessig-Mischung zugesetzt. Da sich DMB-Poly-L-Lysin nicht in der Mischung löste, wurde noch 2 Stunden mit Ultraschall (Ultraschallbad: Bandelin Sonorex TK 52 Transistor) behandelt. Dann wurde das HBr/Eisessig im Vakuum abgezogen, der Rückstand in dest. deion. Wasser aufgenommen und die Mischung mit verdünntem Ammoniak auf pH 7 eingestellt. Die Lösung wurde 2 Tage gegen 0,01 N Essigsäure dialysiert. Die Dialyseflüssigkeit wurde jeweils einige Minuten unter Rühren entgast. Während der Dialyse wurde Stickstoff (Messer Griesheim GmbH) durch die Flüssigkeit geleitet, um die Oxidation von DHB-Poly-L-Lysin zu verhindern.

2.2.5.3. Synthese von Aerobactin-Poly-L-Lysin

Reinigung des Aerobactins über Biogel-P4

Das gemäß Literatur (7) bis nach Amberlite XAD-2 (Röhm und Haas Co., Philadelphia, USA) gereinigte Material wurde in dest. deion. Wasser aufgenommen, der unlösliche Anteil abzentrifugiert (4000 rpm, Heraeus Christ Minifuge) und auf Biogel-P4-Säule(in dest. deion. Wasser gequollen) aufgetragen (Maße der Säule: 40 x 3 cm). Eluiert wurde mit dest. deion. Wasser (48 ml/Stunde; Schlauchpumpe LKB Bromma, 2115 Multiperpex) und nach etwa 2 Stunden, als die erste farbige Bande das Ende der Säule erreicht hatte, 6-Minuten-Fraktionen aufgefangen (Fraktionssammler: ISCO Modell 328). Jede zweite Fraktion wurde chromatographisch untersucht (Laufmittel: Methanol/Wasser). Als Vergleichssubstanz wurde gereinigtes Aerobactin verwendet. Die Aerobactin enthaltenden Fraktionen wurden vereint und lyophilisiert. 570 mg Material nach Amberlite XAD-2 wurde in zwei Säulenläufen (Auftragsmenge

168 bzw. 402 mg in jeweils 2 ml Wasser) gereinigt und ergab nach Lyophilisation 290 mg Aerobactin.

Kupplung von Aerobactin an Poly-L-Lysin mit N-Äthyl-N'-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid (1)

Ansatz: 100 mg Poly-L-Lysin x HBr (480 µMol, bezogen auf die ε-Aminfunktion) wurden in 1 ml 0,1 N HCl gelöst, 108 mg Aerobactin (672 g pro Mol; 160 µMol) in 1,5 ml 0,1 N HCl zugegeben, 77 mg N-Äthyl-N'-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid (wasserlösliches Carbodiimid) zugesetzt und bei Raumtemperatur gerührt.

Aufarbeitung: Nach 7 Stunden wurde die trübe Reaktionsmischung in einen Dialyseschlauch (Ausschlußgrenze 6000 - 8000) gefüllt und 2 Tage gegen dest. deion. Wasser dialysiert. Der unlösliche Rest wurde abzentrifugiert. Der orangerote Überstand wurde lyophilisiert.

Reinigung: Das Lyophilisat wurde in 2 ml 0,01 N Essigsäure gelöst und einer Gelfiltration unterworfen (Sephadex G-15; Säule: Durchmesser 2,8 cm, Höhe 30 cm; Ausschlußvolumen 62 ml, bestimmt mit Dextranblau). Eluiert wurde mit 0,01 N Essigsäure (56 ml/Stunde).

2.2.6. Immunisierung

1 - 4 mg Antigen (Aerobactin- bzw. DHB-Poly-L-Lysin) wurde in 500 µl Saline gelöst. In eine Spritze ohne Stempel, die an der Spitze mit Parafilm verschlossen war, wurde die Antigenlösung und 500 µl Freund'sches Adjuvans eingefüllt und 2 Minuten mit dem Ultraschallstab (Labsonic 1510, B. Braun) emulgiert. Die Emulsion wurde einem Kaninchen in die Hautfalten an den Hinterläufen eingespritzt. Nur bei der Erstimmunisierung wurde komplettes Freund'sches Adjuvans verwendet, ansonsten inkomplettes. In einigen Fällen (siehe Tabelle 4) wurden zusätzlich 50 µl Aluminiumhydroxyd-γ-Gel (2 % $Al(OH)_3$-

Trockensubstanz in Wasser) zugesetzt. Dies bewirkt, daß das Antigen nur langsam freigesetzt wird.

2.2.7. Serengewinnung

Über der Vene am Rand des Kaninchenohres wurden die Haare mit dem Skalpell abrasiert. Daraufhin wurde die Ohrspitze mit Xylol eingerieben, um die Durchblutung des Ohres zu verstärken. Als die Vene gut sichtbar war, wurde sie an der rasierten Stelle angeritzt und das Blut im Zentrifugenglas aufgefangen. Nach Stillstand der Blutung wurde das Ohr gut mit Alkohol und Wasser abgerieben, um das Xylol zu entfernen.

Das Blut wurde in den Kühlschrank gestellt und nach etwa 2 Stunden der Blutkuchen mit einem Glasstab von der Glaswand gelöst. Nach einer Nacht im Kühlschrank wurde das Blut 15 Minuten bei 1500 rpm (Heraeus Christ, Minifuge) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde nochmals 1 Stunde bei 3000 rpm zentrifugiert und dann portionsweise in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt.

2.2.8. Abtrennung der Antikörper vom Serum

Serum wurde mit dem gleichen Volumen Natriumsulfat-Lösung (32 g plus 100 ml dest. deion. Wasser) sehr langsam unter Rühren bei Raumtemperatur versetzt und dann noch eine halbe Stunde gerührt. Der Niederschlag wurde 15 Minuten bei 5000 rpm (Heraeus Christ, Minifuge) abzentrifugiert, in M9-Salz-Lösung (Konzentration wie in M9-Medium) aufgenommen und die Fällung wiederholt. Der Niederschlag wurde zweimal mit 16-prozentiger Natriumsulfat-Lösung (16 g plus 100 ml dest. deion. Wasser) gewaschen, dann in M9-Salzlösung (ein Fünftel des Ausgangsvolumens an Serum) aufgenommen und ausgiebig zuerst gegen M9-Salz-Lösung/10 mM EDTA und dann noch gegen M9-Salz-Lösung dialysiert.

2.2.9. Proteinbestimmung (5, 14)

Lösung A: 0,5 M Natriumborat, pH 9
Lösung B: Fluram (Fluorescamin) 0,3 mg/ml in getrocknetem Dioxan

Die Antikörperlösungen wurden 1:750 bzw. 1:375 mit Lösung A verdünnt.

Testansatz: 1,5 ml Proteinlösung wurde mit 500 µl Lösung B auf dem Vortex gemischt (Vortex-Genie, Bender und Hobein) und die Fluoreszenz gemessen, nachdem alle Proben gemischt waren (Eppendorf-Photometer 1101M mit Fluoreszenz-Zusatz 1030).

Anregungsbereich: 405 - 436 nm, Meßbereich: 470 - 3000 nm. Die Eichung wurde im Bereich von 1 - 80 µg mit Rinderserumalbumin durchgeführt.

2.2.10. Immunologische Methoden

2.2.10.1. Immundiffusion nach Ouchterlony (59)

1 % Agarose in Saline wurde durch Erhitzen im Wasserbad gelöst und je 1,5 ml in Petrischalen (Durchmesser 35 mm) pipettiert. Nach dem Erstarren wurden mit einer Stanzvorrichtung ein Lochkranz (6 Löcher im Abstand von 5 mm um ein Zentralloch) ausgestochen. Die ausgestanzten Agarpfropfen wurden mit Pasteurpipette und Wasserstrahlvakuum herausgesaugt. In jede Vertiefung wurden 5 µl Lösung pipettiert und die Platte bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.10.2. ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) (16,75)

Lösungen

A) Phosphat-gepufferte Saline 10fach konzentriert
80 g NaCl
2 g KH_2PO_4
14 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O
2 g KCl
2 g NaN_3
ad 1 l mit dest. deion. Wasser

b) Phosphat-gepufferte Saline/Tween 10fach konzentriert
100 ml Lösung A) plus 0,5 ml Tween 80
Anstelle von Tween 80 wurde auch TRITON X-100 verwendet.

C) TRIS-Puffer: 50 mM, pH 8

D) 1 % BSA in TRIS 50 mM, pH 8
Das Rinderserumalbumin wurde jeweils vor Serenverdünnung zugesetzt.

E) Diäthanolamin, 1 M, pH 9,8
9,7 ml Diäthanolamin wurde mit 80 ml dest. deion. Wasser vermischt, 0,5 ml 100 mM $MgCl_2$ zugegeben, mit 6 N HCl auf pH 8,9 eingestellt und mit dest. deion. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Durchführung

1. Schritt: Antigenbindung an die Platte
200 µl Antigenlösung (100 µg/ml in Saline) wurden in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Greiner, Artikel Nr. 655161, mit flachem Boden) pipettiert. Die Platte wurde in einer Feuchtkammer über Nacht bei 4°C inkubiert, die Antigenlösungen entfernt und die restliche Flüssigkeit sehr gründlich ausgeklopft. Die Vertiefungen wurden dreimal mit Lösung B luftblasenfrei ausgefüllt, 3 Minuten stehengelassen, die Flüssigkeit abgegossen und die Platte gut ausgeklopft.

2. Schritt: Bindung der Antikörper
Die Seren wurden mit Lösung D verdünnt und 200 µl pro Loch

eingefüllt. Nach 2 Stunden in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur wurde wieder wie oben dreimal mit Lösung B gewaschen.

3. Schritt: Bindung der Enzym-gekoppelten Antikörper
Die Stammlösung der Enzym-gekoppelten Antikörper (alkaline Phosphatase-Anti-Rabbit IgG (Goat), Miles) wurde 1:32000 mit Lösung D verdünnt und 200 µl pro Vertiefung pipettiert, 2 Stunden in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert und dann wie oben dreimal mit Lösung B gewaschen.

4. Schritt: Enzymreaktion
Paranitrophenylphosphat wurde in Lösung E, die auf Raumtemperatur gebracht war, gelöst (1 mg Paranitrophenylphosphat/ml) und jeweils 200 µl in die Vertiefungen gegeben. Nach 45 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 3 M NaOH gestoppt und die Extinktion bei 405 nm mit dem Photometer Titertek Multiskan gemessen.
Zu beachten ist, daß die äußersten Löcher der Mikrotiterplatte nicht verwendet werden, da die photometrische Bestimmung hier ungenau wird. Die 8 Löcher der zweiten Spalte werden als Vergleich mit 200 µl Lösung E und 50 µl 3 M NaOH gefüllt.

2.2.11. Wachstum von E. coli H646 unter dem Einfluß von Antikörpern und Eisen-Mangelbedingungen

Erzeugung des Eisen-Mangels

Vorbehandlung der Glaswaren: Gläser und Pipetten wurden dreimal mit 10 mM EDTA und anschließend sechsmal mit dest. deion. Wasser gespült.

Eisen-Extraktion aus M9-Salz- und Glucose-Lösungen

44 g Glucose x H_2O wurde unter Erwärmen in 56 g dest. deion. Wasser gelöst und über Chromatographie an Chelex 100 (einem Ionenaustauscher mit Aminodiessigsäure-Gruppen, die mit Schwermetallionen feste Komplexe eingehen) von Eisen gereinigt. M9-Salz-Lösungen wurden 10fach konzentriert aufgetra-

gen, die ersten 85 ml (Totvolumen der Säule) verworfen und solange mit dest. deion. Wasser nachgespült, bis eine 5fach konzentrierte Lösung entstanden war.

Regeneration der Chelex 100-Säule

Der Säuleninhalt wurde mit doppeltem Volumen 1 N HCl 15 Minuten bei 90°C erwärmt. Nach Dekantieren wurde mehrfach in dest. deion. Wasser aufgeschlämmt und dekantiert. Danach wurde in doppeltem Volumen 1 N NaOH aufgenommen und nach Dekantieren wieder mehrfach in dest. deion. Wasser suspendiert und nach Absitzenlassen der Überstand verworfen. Nach Einfüllen in die Säule wurde sehr lange mit dest. deion. Wasser gespült, bis pH 7 erreicht war. Das Material wurde lichtgeschützt und unter Zusatz von Chlorhexidin (0,2 g/l) aufbewahrt.

Lebendkeimzahlbestimmung

Lösungen:

A) 10 ml 5fach konzentrierte M9-Salzlösung (eisenextrahiert)
10 ml Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin (je 1 mg/ml)
2 ml para-Hydroxybenzoesäure, para-Aminobenzoesäure (2 mM)
1 ml Glucose (40 %)
1 ml Thiamin (1 mg/ml)
0,1 ml $MgSO_4$
0,1 ml $CaCl_2$
32,9 ml dest. deion. Wasser
Endvolumen 57,1 ml
mit Ausnahme des M9-Salzes doppelte Konzentrationen wie im M9-Medium.

B) M9-Salz-Lösung: Konzentration wie im M9-Medium
10 ml M9-Salz-Lösung (5fach konzentriert, eisenextrahiert) wurden auf 57,1 ml mit dest. deion. Wasser aufgefüllt.

C) Die fraktionierten Antikörper-Lösungen wurden mit Lösung B auf 10 mg Protein/ml verdünnt. Gleiches Volumen an Lösung A wurde zugegeben und die Mischung sterilfiltriert.

Bakterienkultur:

10 ml M9-Medium (Glucose- und M9-Salz-Lösung eisenfrei) wurde mit E. coli H646 angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (Gyrotory Waterbath-Shaker-Modell G75, New Brunswick Scientific). 5 ml wurden 10 min bei 4000 rpm (Heraeus Christ, Minifuge) zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit M9-Medium (eisenfrei) gewaschen, in M9-Medium aufgenommen und auf etwa 5000 Zellen/ml mit eisenfreiem M9-Medium verdünnt.

In Reagenzgläser mit Aluminium-Kappen wurde 900 µl Lösung C vorgelegt, 100 µl der Bakterienverdünnung zupipettiert, bei 37°C inkubiert und von Zeit zu Zeit Proben entnommen. Zu Beginn wurden pro Probennahme je 100 µl Kulturansatz auf zwei TY-Platten ausgestrichen. Die späteren Verdünnungen wurden mit sterilen Mikrotiterplatten (Flacon, Katalog-Nr. 3040F) durchgeführt, wobei das Gesamtvolumen pro Vertiefung 100 µl nicht überschritt. Zur Durchmischung wurde die Mikrotiterplatte mit dem AM 69 Microshaker, Dynatech geschüttelt. Je Probe wurden parallel zwei Verdünnungsreihen durchgeführt und 80 bzw. 90 µl der Verdünnungen auf TY-Platten mit dem Drigalsky-Spatel verteilt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Einzelkolonien ausgezählt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Eigenschaften von Enterochelin-Analogen in Bezug auf den Eisentransport bei Escherichia coli

In Analogie zum Enterochelin-Molekül wurden Substanzen synthetisiert, die sich teilweise nur gering (z.B. MECAM, siehe Abb. 7) von Enterochelin unterscheiden, aber auch solche, die sehr stark abweichen (z.B. 3,4-LICAMS, Me_3MECAMS, siehe Abb. 6). Allen gemeinsam ist die Komplexierung des Eisens über sechs phenolische Hydroxyl-Gruppen. Es fragt sich, wie weit die Struktur von Enterochelin abweichen darf, ohne die Verwendbarkeit für die Eisenversorgung zu beeinträchtigen, und ob der für Enterochelin charakteristische Transportweg benutzt werden kann. Auch ist der Beitrag der anderen Eisentransportsysteme bei der Verwendung der Modellsubstanzen als Eisenlieferanten von Interesse.

So wurde als erstes der Einfluß der Modellsubstanzen auf das Wachstum der Bakterien unter Eisenmangel untersucht. Die verwendeten Stämme tragen zum Teil Mutationen in den verschiedenen Eisentransportsystemen. Danach wurde die Eisenaufnahme der aktiven Modellsubstanzen untereinander mehr quantitativ beim Stamm AB2847 verglichen, der intakte Eisentransportmechanismen besitzt. Als weiteren Hinweis für die Bindung der Modellsubstanzen an den Enterochelin-Rezeptor FepA wurde die Aufhebung der Colicin B-Wirkung herangezogen.

3.1.1. Wirkung der Enterochelin-Analogen auf das Wachstum von E. coli K-12-Stämmen

Durch den Einsatz von Succinat als C-Quelle (M631-Medium siehe Methoden 2.1.2.) wird der Eisenbedarf der Zelle erhöht, da der Metabolismus von Succinat von der Atmungskette

mit seinen eisenhaltigen Cytochromen und Nicht-Häm-Eisen-Proteinen abhängig ist. Die verwendeten Stämme konnten nicht mehr ihren eigenen Eisenchelator Enterochelin produzieren, da sie im aroB-Gen mutiert waren.

Die Ergebnisse des Wachstumstests (siehe Methoden 2.2.2.) sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Betrachtet man die Stämme AB2847 und AN92, die intakte Eisentransportsysteme besitzen, so zeigt sich, daß FeMECAM als Enterochelin-ähnlichste Substanz (siehe Abb. 7) Eisen an die Zelle liefern kann. Das gleiche gilt für FeTRIMCAM, das sich von FeMECAM nur durch Austausch der Carbonyl- und Aminfunktionen unterscheidet. Auch $FeMe_3$MECAM, das am Stickstoff methyliert ist, fördert das Wachstum der Bakterien, wenn auch etwas schwächer. FeMECAMS, FeTRIMCAMS, $FeMe_3$MECAMS, die im Vergleich zu den obigen Substanzen zusätzliche Sulfongruppen am C-5 der 2,3-Dihydroxybenzoesäuren tragen, können die Zelle nicht mit Eisen versorgen.

Im Gegensatz dazu fördert die lineare, sulfonhaltige Modellsubstanz Fe3,4-LICAMS das Wachstum. Fe3,4-LICAMC, das am C-4 der Dihydroxybenzoesäuren Carboxylfunktionen trägt, gestattet kein Wachstum.

Um festzustellen, auf welchem Weg das Eisen in die Bakterienzelle gelangt, wurden Stämme verwendet, die eine oder mehrere Mutationen in den Eisentransportgenen tragen. Dabei zeigt sich, daß die drei Gene tonB, fepB, fesB intakt sein müssen, um Wachstum mit den aktiven Modellsubstanzen zu erlauben. Das Rezeptorprotein für Enterochelin, FepA, scheint nicht notwendig zu sein.

Deshalb wurde untersucht, ob Rezeptoren anderer Eisentransportsysteme die Aufgabe von FepA übernehmen können. Die fepA, fecA - Doppelmutante zeigt schwächeres Wachstum als die fepA-Einzelmutante. Die Doppelmutation fepA, fhuA beeinflußt die Wachstumsförderung nicht. Wird eine dritte Mutation eingeführt (fepA, fhuA, cir), kann die Mutante mit Fe3,4-LICAMS nicht mehr und mit $FeMe_3$MECAM nur noch schwach wachsen. Die Doppelmutation fepA, cir wächst in Gegenwart

Tabelle 3: Wachstumsförderung von E. coli K-12-Stämmen durch Enterochelinanaloge

Stamm	Merkmale	Modellsubstanzen									
		MECAM	Me_3MECAM	TRIMCAM	MECAMS	Me_3MECAMS	TRIMCAMS	LICAMS	LICAMC	Diisp. LICAM	DHB
AB2847	aroB	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
AN92	aroB	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
AN260	fepB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AN272	fesB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR158	tonB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
IR20	fepA	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
AN92/B3	fepA	+	(+)	+	-	-	-	+	-	-	+
IR20A	fepA fhuA	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
WA1024	fepA fecA	(+)	(+)	(+)	-	-	-	(+)	-	-	(+)
IR20/111	fepA fhuA cir	+	(+)	+	-	-	-	-	-	-	+
VR42	cir	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
VR42/B9	fepA cir	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
AN299/23	fepA fecB	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+

Jede Substanz wurde zweimal getestet. + Substanz fördert das Wachstum; - kein Wachstum mit dieser Substanz; (+) nur schwaches Wachstum sichtbar.

von Fe3,4-LICAMS auch nicht. Mutation im cir-Gen allein hat keinen Einfluß auf die wachstumsfördernde Wirkung der Modellsubstanzen. Es zeigt sich folglich, daß nur eine Anhäufung von Mutationen in den Rezeptorproteinen der äußeren Membran die Wirksamkeit der Enterochelinanalogen herabsetzt, besonders bei den schwächer aktiven.

Auffallend ist, daß die Mutante, die im fepA- und fecB-Gen mutiert ist, als einziger Stamm FeMECAMS verwenden kann. Außerdem wächst sie auch mit FeDiisp-3,4-LICAM, das ansonsten nur von AB2847 und der cir-Mutante benutzt werden kann. Die Mutante AN299/23 (fepA, fecB) ergibt wie VR42 (cir) keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit von FeLICAMC (in der Tabelle als negativ geführt).

Mit Dihydroxybenzoesäure (DHB) erhält man die erwarteten Ergebnisse, d.h. die Mutationen im fepB- und fesB-Gen gestatten kein Wachstum unter diesen Bedingungen, wohingegen alle anderen Mutationen, einschließlich der Mutation im tonB-Gen, die Eisenversorgung nicht verhindern.

3.1.2. Eisentransportstudien mit den Modellsubstanzen

FeMECAM, FeTRIMCAM, $FeMe_3$MECAM, Fe3,4-LICAMS und Fe3,4-Diisp-LICAM ermöglichen dem Stamm AB2847, auf M631-Medium zu wachsen. Bei Betrachtung der Eisentransportraten zeigen sich jedoch Unterschiede. Der Transport mit MECAM ist am schnellsten, mit TRIMCAM sehr viel langsamer (siehe Abb. 8A). Mit Me_3MECAM, 3,4-LICAMS und Diisp-3,4-LICAM wird nach kurzer Zeit bereits ein Plateau auf niedrigem Niveau erreicht (siehe Abb. 8B), eine kontinuierliche Aufnahme ist nicht ersichtlich.

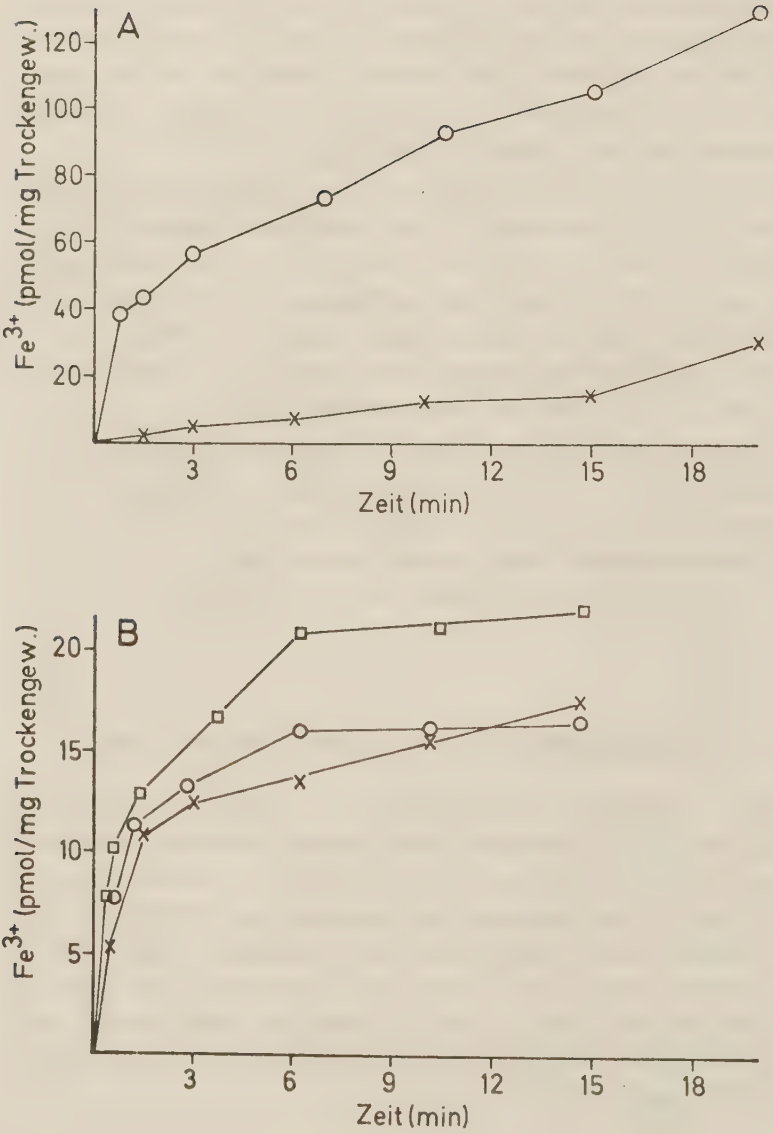


Abb. 8A: Eisen(III)-Aufnahme als MECAM (o)- und als TRIMCAM (x)-Komplex durch den Stamm E. coli AB2847.

Abb. 8B: Eisenaufnahme als Diisp-3,4-LICAM (□)-, 3,4-LICAMS (o)- und Me_3MECAM (x)-Komplex durch den Stamm E. coli AB2847.

Zu beachten ist die unterschiedliche Skala von 8A und 8B.

3.1.3. Hemmung der Colicin B-Wirkung durch die Enterochelin-Analogen

Da Colicin B ebenso wie Enterochelin das FepA-Protein als Rezeptor verwendet und Enterochelin in der Lage ist, mit Colicin B um diesen Rezeptor zu konkurrieren, wurde untersucht, ob die Enterochelin-Analogen ebenfalls dazu fähig sind.

Im Plattentest (siehe Methoden 2.2.4.) erzeugt das Colicin B nach der langen Diffusionszeit einen kreisrunden Hemmhof von 23 mm Durchmesser, an dessen Peripherie die Filterrondellen mit den Eisenchelatoren liegen. Auf der Seite der FeMECAM-Filterrondelle ist der Hemmhofradius bereits bei 20 nMol deutlich verringert, bei 200 nMol noch stärker. Die anderen Modellsubstanzen heben die Wirkung von Colicin B nicht auf. $FeMe_3$MECAM, $FeMe_3$MECAMS und FeTRIMCAM zeigen ihrerseits bei 200 nMol Substrat pro Filterrondelle zusätzlich einen kleinen, trüben Hemmhof.

Auch in Flüssigkultur zeigt FeMECAM kompetitive Wirkung zu Colicin B. In allen Fällen ist das Wachstum anfänglich stärker mit FeMECAM als ohne Zusatz. Bei höherer Colicin B-Konzentration ($1 : 5 \times 10^4$) reicht das Colicin B jedoch aus, das Wachstum zu unterbinden (siehe Abb. 9). Da das Verhältnis von Colicin B zu FeMECAM entscheidet, ob Wachstum über längere Zeit stattfindet, scheinen Colicin B und FeMECAM um den gleichen Rezeptor zu konkurrieren. Wachsen die Bakterien, nimmt die Zahl der Rezeptoren zu. Nicht jeder kann mehr durch FeMECAM blockiert werden, und Colicin B kann bei hoher Konzentration doch noch jede Zelle erreichen. Bei geringer Colicin B-Konzentration wird nur noch ein Teil der Zellen geschädigt und die anderen können weiterwachsen.

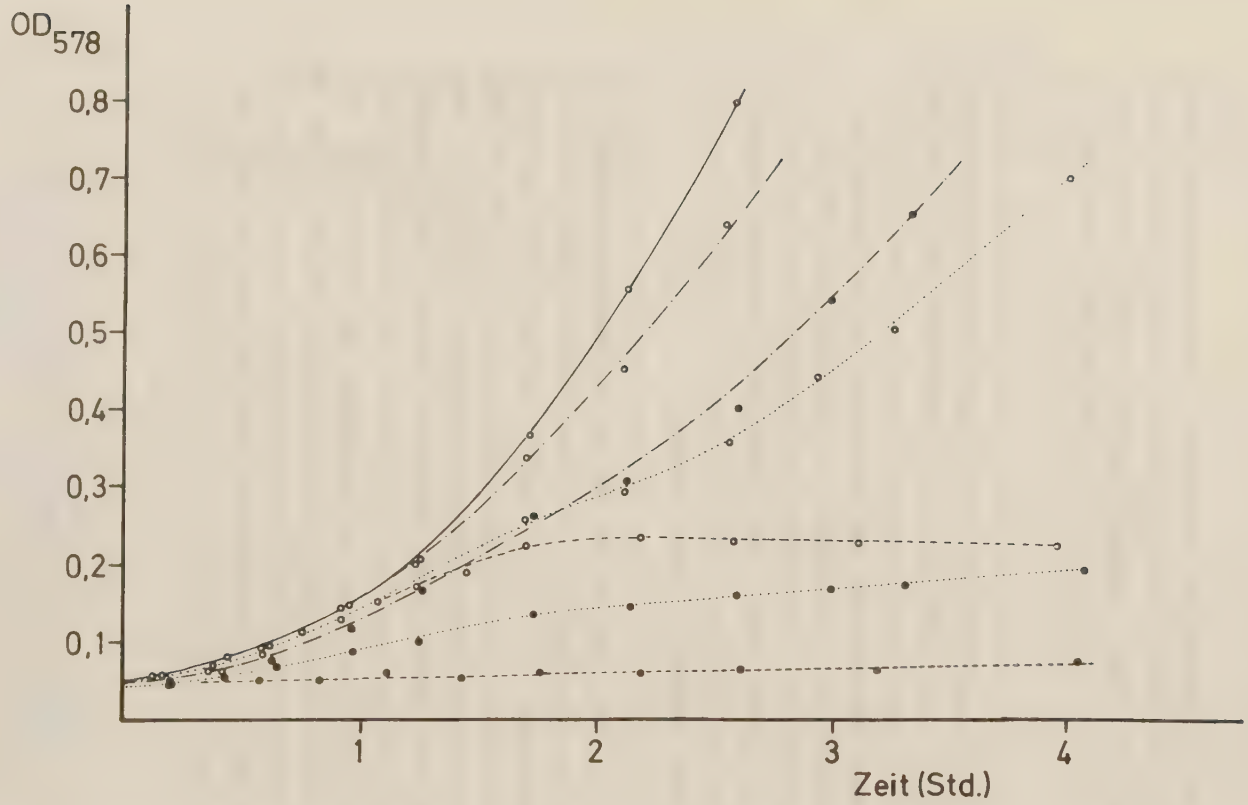


Abb. 9: Hemmung der Colicin B-Wirkung durch FeMECAM. Wachstumskurven des Stammes AB2847 mit Colicin B (●) und solche mit Colicin B und 5 µM FeMECAM (o). Eingesetzt wurden folgende Colicin B-Verdünnungen: (----) $1:5x10^4$, (····) $1:10^5$ und (-·-·-) $1:5x10^5$. (——) Wachstum nur mit 5 µM FeMECAM.

3.2. Herstellung der Antigene DHB- bzw. Aerobactin-Poly-L-Lysin und Untersuchungen zu ihrer Eignung als Antigene

Um sich im Serum vermehren zu können, müssen sich Bakterien mit Eisen versorgen. Sie erreichen dies durch Produktion von hochaffinen Eisenchelatoren. Antikörper, die diese Eisenchelatoren binden, sind gut geeignet, dieses Unterfangen der Bakterien zunichte zu machen. Obwohl Enterochelin zu klein ist, um eine Antikörperproduktion hervorzurufen, wurden in normalem menschlichem Serum Enterochelin-spezifische Antikörper gefunden (55).

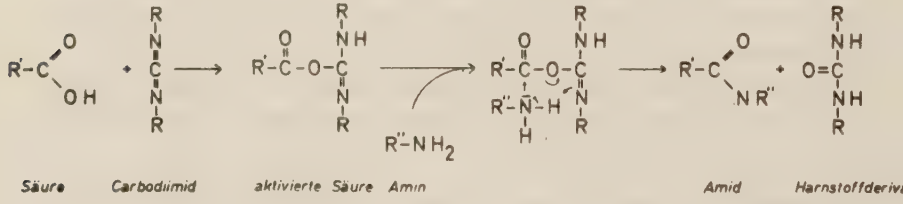
Es stellt sich die Frage, ob nicht durch Kupplung von Enterochelin bzw. Aerobactin an einen inerten Träger Antikörper gegen die Chelatoren induziert werden können, um damit die Abwehrmechanismen des angegriffenen Organismus zu unterstützen.

Diese Frage wurde angegangen, indem 2,3-Dihydroxybenzoesäure, ein Bestandteil des Enterochelins, und Aerobactin mittels Carbodiimidkupplung an Poly-L-Lysin gebunden wurde. Die Hydroxylgruppen der 2,3-Dihydroxybenzoesäure waren bei der Kupplung durch Methylgruppen geschützt und wurden durch anschließende Ätherspaltung freigesetzt.

Mit den so gewonnenen Antigenen (DHB- bzw. Aerobactin-Poly-L-Lysin) wurde je ein Kaninchen mehrfach immunisiert und die gewonnenen Seren mittels Immundiffusion und ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) untersucht. Außerdem wurde das Wachstum von E. coli H646, der Aerobactin bilden kann, unter Eisenmangel in Gegenwart von Antikörpern verfolgt.

3.2.1. Antigensynthese

Die Synthese von DHB- bzw. Aerobactin-Poly-L-Lysin beinhaltet jeweils einen Kupplungsschritt. Allgemein liegt dabei folgendes Reaktionsschema zugrunde.



Man nimmt an, daß die Aktivierung der Carboxylfunktion über eine kovalente Bindung des Carbodiimids erfolgt.

3.2.1.1. Synthese von DHB-Poly-L-Lysin

Kupplung von 2,3-Dihydroxybenzoesäure an Poly-L-Lysin

Der Ansatz mit 2,3-Dihydroxybenzoesäure (siehe Methoden 2.2.5.2.) wurde nach Durchleiten von Stickstoff in verschlossenem Schnappdeckelgläschen über Nacht gerührt. Das Chromatogramm (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser) ergab, daß Poly-L-Lysin unverändert vorlag. Poly-L-Lysin bleibt an der Auftragsstelle liegen und zeigt keine Fluoreszenz oder UV-Absorption, keine Farbreaktion mit Eisen(III)-Chlorid und ist mit Ninhydrin und TDM anfärbbar. Es war außer den eingesetzten Substanzen nur eine neue Substanz entstanden, die stark fluoreszierte und sich mit Eisen(III)-Chlorid schwach anfärben ließ. DHB fluoresziert ebenfalls, gibt mit Eisen(III)Chlorid aber eine starke Blaufärbung. Das Ergebnis wäre gut damit erklärbar, daß DHB mit sich selbst reagiert hat und so dieser Ansatz nicht zum Erfolg führte.

Kupplung von 2,3-Dimethoxybenzoesäure an Poly-L-Lysin

Bei derKupplung von 2,3-Dimethoxybenzoesäure (DMB) (siehe Methoden 2.2.5.2.) bildete sich eine Substanz, die wie Poly-L-Lysin an der Auftragsstelle liegen blieb (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser), die aber zusätzlich im UV-Bereich absorbierte. Das deutete darauf hin, daß DMB an Poly-L-Lysin gebunden worden war. Die Substanz ergab mit Eisen(III)-Chlorid keine Farbreaktion. DMB, das nicht fluoresziert und UV-Absorption zeigt, besitzt in diesem Chromatographiesystem einen Rf-Wert von etwa 0,8. Nach Aufarbeitung der Reaktionsmischung (siehe Methoden 2.2.5.2.), Dialyse und Lyophilisation erhielt man 96 mg DMB-Poly-L-Lysin. Ausgegangen wurde von 136 mg Poly-L-Lysin x HBr.

Um die Beladung des Poly-L-Lysins zu bestimmen, wurde ein Protonen(^{1}H)-Resonanz-Spektrum der erhaltenen Substanz aufgenommen (86). Als Vergleich diente das ^{1}H-Resonanz-Spektrum von Poly-L-Lysin x HBr. Dazu wurden 6 mg Poly-L-Lysin x HBr in 500 µl deuteriertem Wasser (D_2O) gelöst und mit dem Bruker WP-80 ein Spektrum aufgenommen. Das Lösungsmittel D_2O bewirkt, daß die Protonen am Stickstoff und der End-Carboxyl-Gruppe kein Signal hervorrufen, da sie schnell gegen den deuterierten Wasserstoff ausgetauscht werden.

Das Signal bei 4,3 ppm (siehe Abb. 12) ist den Protonen am α-C-Atom (siehe Abb. 10), das bei 2,9 ppm den Protonen am ε-C-Atom und das bei 1,5 ppm den Protonen an den β,γ,σ-C-Atomen zuzuordnen. Die Signale bei 5,4 ppm, 4,7 ppm und 4 ppm werden durch nicht deuteriertes Wasser hervorgerufen (die Signale bei 5,4 und 4 ppm sind Rotationsseitenbanden). Die Gipfel sind alle stark verbreitert, da gleichartige Protonen der verschiedenen Lysinreste sich bedingt durch die Verknüpfung der Lysine doch etwas in ihrer Umgebung unterscheiden. Zusätzlich führen die Protonen benachbarter C-Atome zur Aufspaltung der Signale. Z.B. bewirken zwei Protonen am benachbarten C-Atom die Aufspaltung des Signals in ein Triplett, was bei dem Signal bei 2,9 ppm, hervorgerufen durch das Proton an den ε-C-Atomen, noch andeutungsweise

Abb. 10:

Struktur von Poly-L-Lysin x HBr

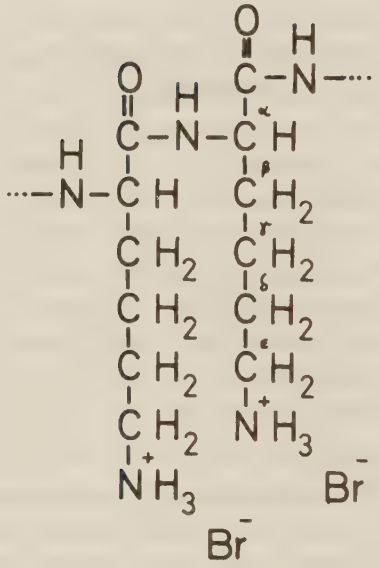
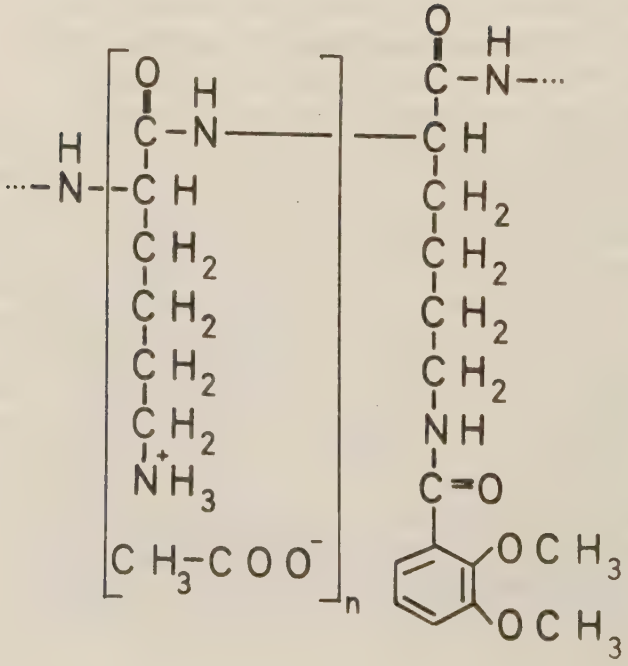


Abb. 11:

Struktur von DHB-Poly-L-Lysin



sichtbar wird. Betrachtet man die dem Spektrum überlagerte Integrationslinie, so ergibt sich bei dem Signal bei 1,5 ppm, dem sechs verschiedene Protonen zugeordnet werden kann, eine Höhe von etwa 8 mm pro Proton (47 mm : 6). Berücksichtigt man dies bei den Signalen bei 4,3 ppm (6 mm : 8 mm pro Proton) und bei 2,9 ppm (18 mm : 8 mm pro Proton), so ist das Verhältnis der Protonen, die zu den einzelnen Signalen beitragen, ungefähr 1:2:6, was dem Verhältnis der H_{α} : H_{ε} : $H_{\beta,\gamma,\sigma}$ entspricht.

Das ^{1}H-Spektrum (siehe Abb. 13) von DMB-Poly-L-Lysin (siehe Abb. 11) wurde mit dem Bruker WH-90 aufgenommen. Die Signale des Wassers wurden in diesem Spektrum ausgeblendet. Vergleicht man dieses Spektrum mit dem von Poly-L-Lysin x HBr, so fallen drei zusätzliche Signale auf. Das erste bei 7,2 ppm kann den drei Protonen am aromatischen Ring der 2,3-Dimethoxybenzoyl-Gruppe zugeordnet werden, die Gipfel bei 3,8 ppm und 3,7 ppm den beiden Methyl-Gruppen, wobei die ortho-Methyl-Gruppe durch die Carboxyl-Gruppe stärker entschirmt wird, d.h. bei höherer ppm-Zahl ein Signal ergibt. Wertet man die Integration aus, so erhält man für die sechs Methyl-Protonen eine Höhe von 7 mm und für das Proton am α-C-Atom der Lysinreste eine Höhe von 16 mm. Daraus ergibt sich ein Verhältnis zwischen einem Proton am α-C-Atom und einem Methylproton von 1 : 0,07, d.h. das Poly-L-Lysin ist zu 7 % beladen, was bedeutet, daß im Durchschnitt jedes 14. Lysin eine Dimethoxybenzoesäure-Gruppe trägt.

Ätherspaltung mit HBr/Eisessig

Nach der Behandlung von DMB-Poly-L-Lysin mit HBr/Eisessig/DHB-Gemisch (siehe Methoden 2.2.5.2.) und reichlicher Dialyse mit 0,01 N Essigsäure unter Stickstoff war im Chromatogramm (Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser als Laufmittel) nur noch eine Substanz erkennbar. Sie verhielt sich wie Poly-L-Lysin: sie blieb also an der Auftragsstelle liegen, war mit Ninhydrin und TDM anfärbbar, zeigte zusätzlich aber UV-Adsorption und schwache Fluoreszenz und war mit Fe(III)-Chlorid bläulich anfärbbar.

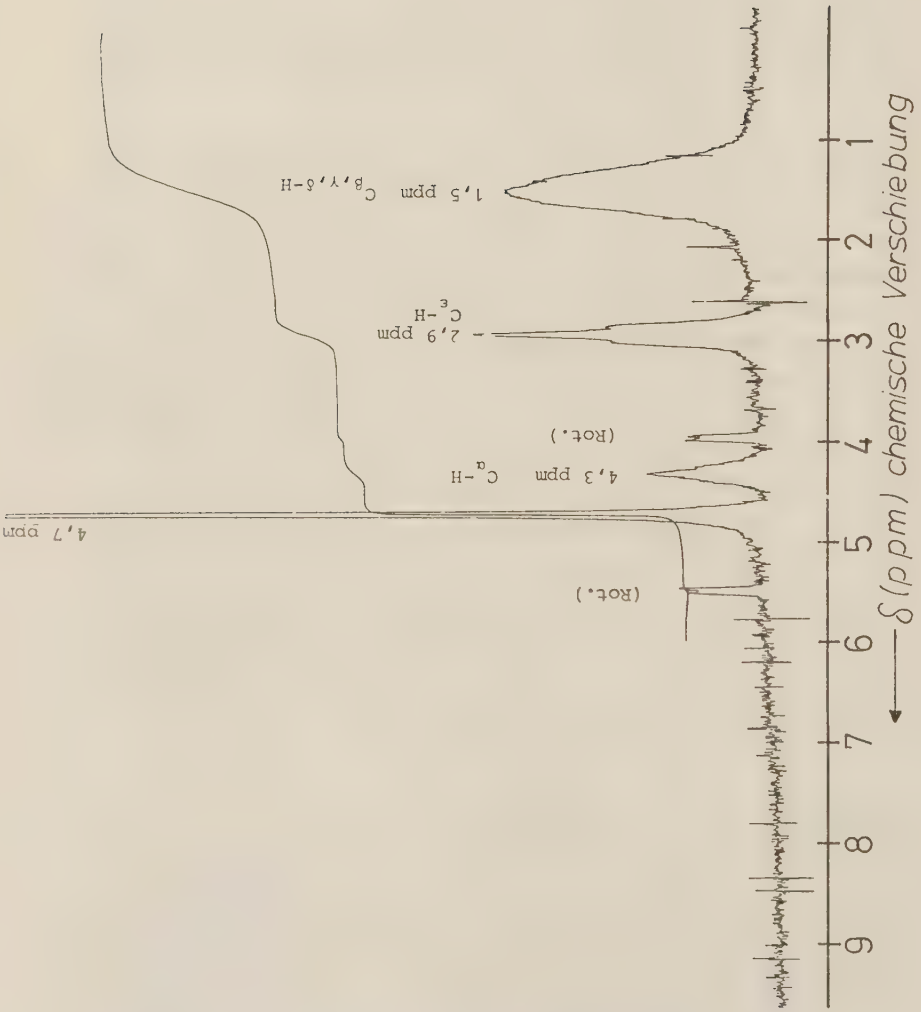


Abb. 12: ^{1}H-NMR-Spektrum von Poly-L-Lysin x HBr (Bruker WP-80, 6 mg/500 µl D_2O, δ-Werte relativ zu Tetramethylsilan, = 0 ppm)

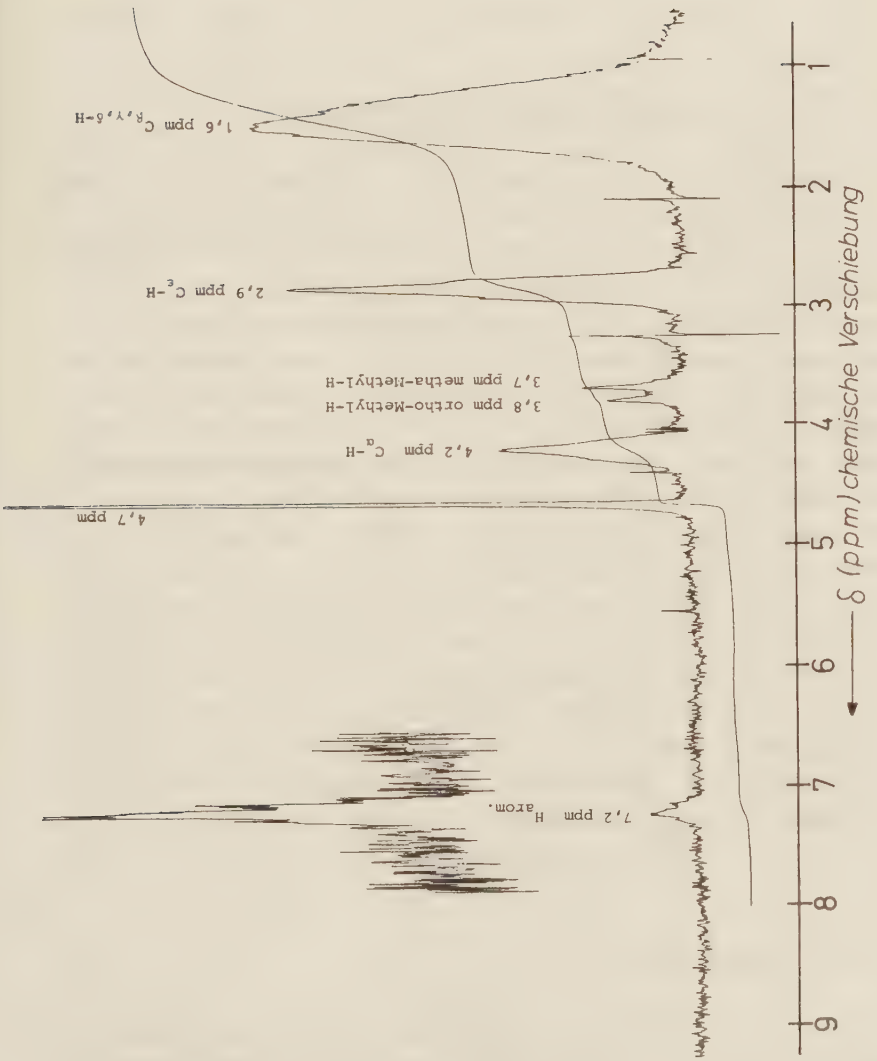


Abb. 13: ^{1}H-NMR-Spektrum von DMB-Poly-L-Lysin (Bruker WH-90, 8 mg/500 µl D_2O)

Durch die Ätherspaltung waren also die Hydroxyl-Gruppen freigesetzt worden, die mit Eisen einen farbigen Komplex bilden. Die Lösung wurde lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

3.2.1.2. Synthese von Aerobactin-Poly-L-Lysin

Da Aerobactin sehr gut wasserlöslich ist, wurde die Kupplung in wässrigem Milieu durchgeführt und das wasserlösliche Carbodiimid N-Äthyl-N'-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid eingesetzt (siehe Methoden 2.2.5.3.). Nach der Dialyse der Reaktionsmischung gegen 0,01 N Essigsäure zeigte das Chromatogramm (Laufmittel: Methanol/Wasser) zwei braune Flecken. Der eine lief wie Aerobactin, der andere blieb an der Auftragstelle liegen, was auf eine erfolgreiche Kupplung hinwies. Mit TDM wurden zusätzlich schwache Verunreinigungen sichtbar. Um die Verunreinigungen und das nicht kovalent gebundene Aerobactin abzutrennen, wurde eine Gelfiltration über Sephadex G-15 angeschlossen. Die roten Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht und enthielten sowohl freies als auch gebundenes Aerobactin. Der Elutionsbereich der beiden Substanzen erstreckte sich über 10 Fraktionen, beginnend mit dem Ausschlußvolumen der Säule. Die Fraktionen mit Aerobactin-Poly-L-Lysin und Aerobactin wurden vereint und lyophilisiert. Es ergaben sich 62 mg. Ausgegangen wurde von 100 mg Poly-L-Lysin.

3.2.2. Immunisierung

Mit den beiden Antigenen Aerobactin- und DHB-Poly-L-Lysin wurde je ein Kaninchen mehrfach immunisiert (siehe Methoden 2.2.6.). Das erste Serum, das Nullserum, bezeichnet das Serum, das vor der ersten Immunisierung gewonnen wurde (siehe

Methoden 2.2.7.). Die Zeitpunkte der weiteren Immunisierungen und Blutentnahmen sind aus der Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Immunisierungen

Anzahl der Tage nach Erstimmunisierung	Antigenmenge (mg)	Serummenge (ml)	Bezeichnung des Serums
DHB-Poly-L-Lysin als Antigen			
0	1	16	O DHB
15	1,3	-	
45	2,6	-	
57	-	15	I DHB
93	2	-	
105	-	10	II DHB
Aerobactin-Poly-L-Lysin als Antigen			
0	1	1,5	O Ae
15	1,4	-	
45	2,3	-	
57	-	7	I Ae
93	3	-	
105	-	18	II Ae
171	2[x]	-	
184	-	25	III Ae
220	3,9[x]	-	
232	4[x]	10	IV Ae
244	-	15	V Ae
253	2,4	-	
265	-	10	VI Ae

x) Zusatz von 50 µl Aluminiumhydroxyl-γ-Gel

3.2.3. Immunologische Methoden

3.2.3.1. Immundiffusion nach Ouchterlony

Beim Ouchterlony-Test diffundieren Antigen und Antikörper aufeinander zu. Wenn Antigen im Überschuß vorhanden ist, bilden sich lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe. Dasselbe gilt bei Überschuß von Antikörper. Nur in dem Fall, in dem die Antikörper zu einer Quervernetzung der Antigenmoleküle führen, kommt es zur Präzipitation.

Um die geeigneten Verdünnungen zu finden, wurden die Antigenlösungen (1 mg Aerobactin- bzw. DHB-Poly-L-Lysin pro ml Saline) mit Saline 1:10 bis $1:10^5$ in 10er Schritten und die Seren mit Saline 1:2 bis 1:32 in 2er Schritten verdünnt. Es wurden jeweils 5 µl in die Löcher in der Agaroseschicht gefüllt (siehe Methoden 2.2.10.1.), wobei im einen Fall unverdünntes Antigen in der Mitte von den verschiedenen Serenverdünnungen, im anderen Fall unverdünntes Serum von Antigenverdünnungen umgeben war. Eingesetzt wurden die Seren O DHB, I DHB, O Ae und I Ae.

Es zeigte sich, daß Aerobactin-Poly-L-Lysin als Antigen in keinem Fall zu Präzipitation führte. Ansonsten ergaben nur die unverdünnten Lösungen Präzipitate. Auch die Nullseren führten zum gleichen Bild. Um dies zu bestätigen, wurden noch weitere Vergleichsseren verwendet: Murein-Lipoprotein-, OmpA-, zwei Hydroxy-Äther-Rutosid-, Maus- und E. coli-K-12-Antiserum. Antigen (1 mg/ml) wurde von den unverdünnten Seren umgeben. Mit Aerobactin-Poly-L-Lysin zeigte nur das I Ae-Serum in einem der beiden Ansätze eine ganz schwache Präzipitationsbande. Alle anderen Seren präzipitierten nicht mit Aerobactin-Poly-L-Lysin, wohl aber mit DHB-Poly-L-Lysin. Außer einer scharfen Präzipitationsbande entstand dabei eine diffuse Präzipitation um das Mittelloch mit dem Antigen.

Als weiteres Antigen wurde Poly-L-Lysin x HBr getestet. Es ergab sich dasselbe Bild wie mit DHB-Poly-L-Lysin.

Um festzustellen, ob DHB die Präzipitation mit DHB-Poly-L-Lysin verhindern konnte, wurde 1 mM DHB in die Agaroseplatten mit eingegossen. Die scharfe Präzipitationslinie wurde dicker und die diffuse Präzipitation schwächer; DHB konnte also die Präzipitation nicht verhindern.

DHB-Poly-L-Lysin löst sich in Wasser nur gallertartig, weswegen auch kein auswertbares ^{1}H-Resonanzspektrum erhalten wurde. Die diffuse Präzipitation könnte eventuell durch Ausfallen von DHB-Poly-L-Lysin bzw. Poly-L-Lysin x HBr nach Hineindiffundieren in die Agarose erklärt werden. Durch die Zugabe von DHB wird der pH in der Platte von 5 auf 4 erniedrigt. Damit ist DHB-Poly-L-Lysin besser löslich und kann in verstärktem Maße zu der Stelle diffundieren, an der die Präzipitation mit den Antikörpern stattfindet.

3.2.3.2. ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)

ELISA kann dazu verwendet werden, Antigenmengen zu bestimmen. Aber genauso gut kann man mit dieser Methode bestimmte Antikörper nachweisen. Dazu wurde in dieser Arbeit immer die gleiche Menge Antigen (hier 100 µg/ml Saline) eingesetzt. Es wurde im ersten Schritt an die Mikrotiter-Platte durch Adsorption gebunden. Im zweiten Schritt wurde die Platte mit Verdünnungen der Seren inkubiert. Die Lösungen enthielten 1 % BSA, um die Antikörper zu stabilisieren und die unspezifische Bindung von Antikörper an die Platte zu verringern. Im dritten und vierten Schritt wurden die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe mit dem enzymgekoppelten Antikörper gegen die Immunglobuline G von Kaninchen nachgewiesen.

Es zeigte sich, daß es günstiger war, die Antigenlösungen jedesmal neu anzusetzen bzw. neu zu verdünnen. Ebenso war die Kontrolle mit Saline statt Antigen von Bedeutung, da die unspezifische Bindung bei geringen Serenverdünnungen stärker war als bei größeren Verdünnungen. Die verschiede-

nen Platten ergaben größenordnungsmäßig gleiche Ergebnisse. Bei den Versuchen zur Aufhebung der Antikörperbindung durch Aerobactin, Mono- und Dilysin wurde immer nur innerhalb einer Platte verglichen.

Um die Spezifität der Antikörper zu klären, wurde Poly-L-Lysin x HBr als Antigen immer als Vergleich verwendet. Die Extinktionsdifferenz im ELISA zwischen Beschichtung mit Poly-L-Lysin einerseits und DHB- bzw. Aerobactin-Poly-L-Lysin andererseits wurde als Maß für die spezifische Reaktion gegenüber dem Hapten DHB bzw. Aerobactin genommen.

DHB-Poly-L-Lysin als Antigen

Um die verschiedenen Seren vergleichen zu können, wurden sie 1:1000 verdünnt in den Test eingesetzt. Aus Tabelle 5 wird ersichtlich, daß alle Seren von Kaninchen, die nicht mit Aerobactin- bzw. DHB-Poly-L-Lysin immunisiert wurden, im ELISA einen höheren Extinktionswert erreichten, wenn DHB-Poly-L-Lysin als Antigen verwendet wurde im Vergleich zu dem Ansatz mit Poly-L-Lysin x HBr (siehe Tabelle 5 ΔE_{405}DHB). Diese Differenz wurde durch Immunisierung mit DHB-Poly-L-Lysin (siehe Seren I DHB, II DHB) nicht erhöht. Auch die Aerobactin-Poly-L-Lysin-Antiseren zeigen kein verändertes Verhalten. Fast alle Seren zeigen Bindung auch an Poly-L-Lysin x HBr (siehe ΔE_{405}Poly-L-Lysin).

Aerobactin-Poly-L-Lysin als Antigen

Trägt man die Verdünnungen der Seren gegen die im ELISA nach 45 min Reaktionszeit erreichten Extinktionen auf (siehe Abb. 14), so wird ersichtlich, daß im Verdünnungsbereich 1:1000 bis 1: 32000 die Extinktion eine lineare Funktion im Bezug auf die Serenkonzentration darstellt. Nur bei I Ae weichen die hohen Extinktionswerte von der Geraden ab. Vergleicht man die Seren untereinander (siehe auch Tabelle 6), so wird deutlich, daß durch wiederholtes Immunisieren (siehe Tabelle 4) der Antikörperspiegel, der an Aerobactin-Poly-L-Lysin bindet, absinkt. Dasselbe Bild ergibt sich für das

Tabelle 5: Extinktionsdifferenzen im ELISA mit Saline, Poly-L-Lysin x HBr und DHB-Poly-L-Lysin als Antigene.

Seren	ΔE_{405} Poly-L-Lysin [1]	ΔE_{405} DHB [2]
O DHB	0,13	0,10
Anti-Murein-Lipoprotein	0,33	0,23
Anti-OmpA	0,22	0,13
Anti-HR(1) [3]	0,12	0,15
Anti-HR(2)	0,12	0,14
Anti-Maus	0,19	0,16
Anti-E. coli-K-12	-0,01	0,12
O Ae	0,15	0,15
I DHB	0,18	0,13
II DHB	0,20	0,10
I Ae	0,15	0,15
II Ae	0,12	0,09

[1] Extinktionsunterschied zwischen Poly-L-Lysin und Saline

[2] Extinktionsunterschied zwischen DHB-Poly-L-Lysin und Poly-L-Lysin

[3] HR ≙ Hydroxy-Äther-Rutosid

Antigen Poly-L-Lysin. Das spricht für eine Toleranzentwicklung des Kaninchens gegenüber diesen Antigenen.

Berücksichtigt man die mit den Vergleichsseren (O Ae, Anti-Murein-Lipoprotein, Anti-OmpA, Anti HR(1), (2), Anti-Maus, Anti-E. coli-K-12, O DHB) erhaltenen Werte, die besagen, daß die Seren mit Ausnahme des Anti-OmpA-Serums besser an Poly-L-Lysin als an Aerobactin-Poly-L-Lysin binden, so kann man eindeutig eine Immunantwort gegen Aerobactin-Poly-L-Lysin erkennen.

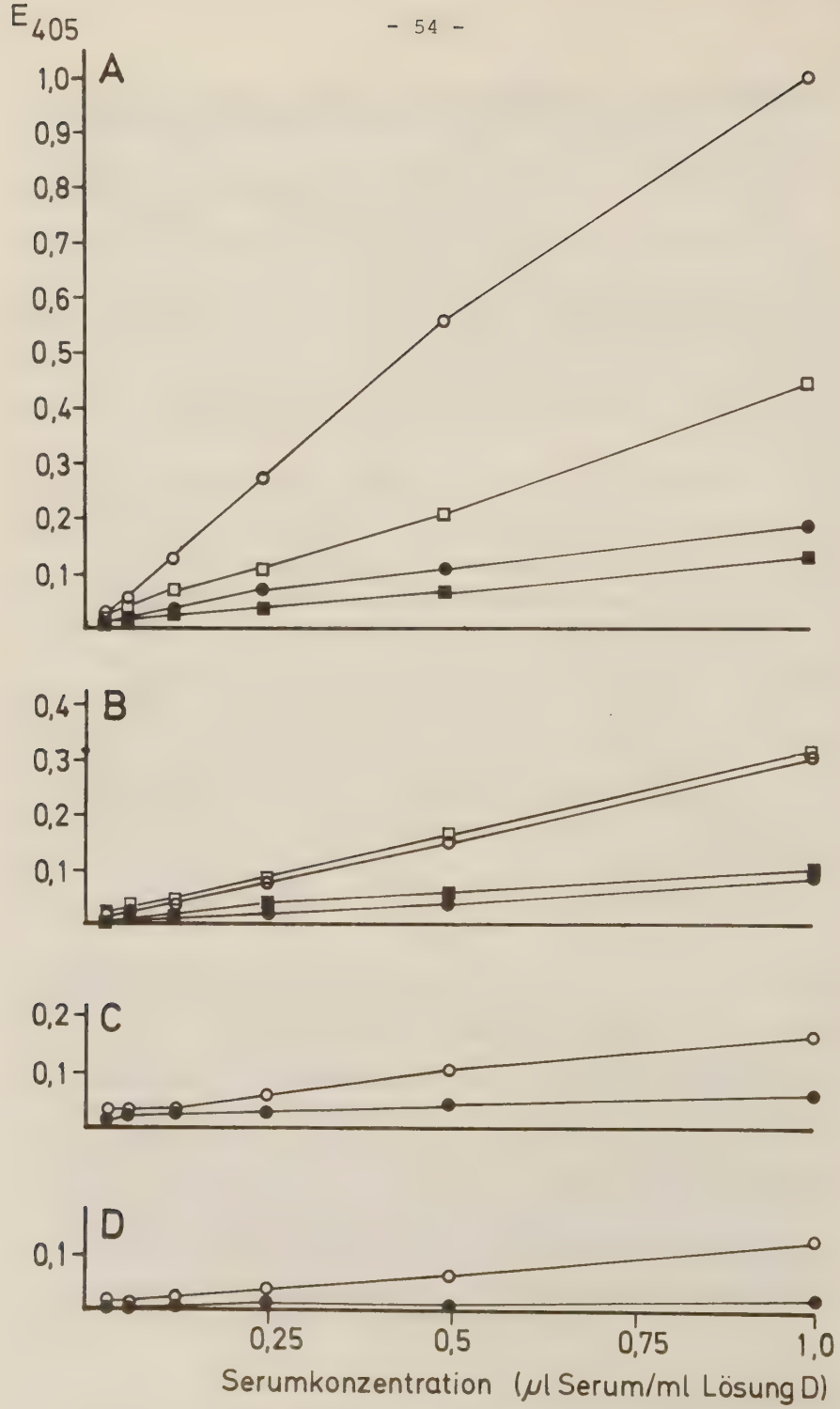

E405
A
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
B
0,4
0,3
0,2
0,1
C
0,2
0,1
D
0,1
0,25
0,5
0,75
1,0
Serumkonzentration (µl Serum/ml Lösung D)

Tabelle 6: Extinktionsdifferenzen im ELISA mit Saline, Poly-L-Lysin und Aerobactin-Poly-L-Lysin als Antigene

Seren[4]	ΔE_{405} Poly-L-Lysin[1]	ΔE_{405} Aerobactin[2]
I Ae	0,19	0,80
II Ae	0,13	0,32
III Ae	0,10	0,21
IV Ae	0,12	0,47
V Ae	0,07	0,10
VI Ae	0,03	0,10
O Ae	0,18	-0,05
Anti-Murein-lipoprotein	0,35	-0,25
Anti-OmpA	0,30	0,76
Anti-HR(1)[3]	0,12	-0,10
Anti-HR(2)	0,21	-0,18
Anti-Maus	0,21	-0,12
Anti-E. coli-K-12	0,03	-0,11
O DHB	0,21	-0,06
I DHB	0,22	0,75
II DHB	0,15	0,13

[1] Extinktionsunterschied zwischen Poly-L-Lysin und Saline

[2] Extinktionsunterschied zwischen Aerobactin-Poly-L-Lysin und Poly-L-Lysin

[3] HR ≙ Hydroxy-Äther-Rutosid

[4] Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

Abb. 14: Extinktion, nach 45 Minuten Reaktionszeit im ELISA in Abhängigkeit von der Serumkonzentration beim Einsatz von 100 µg/ml Aerobactin-Poly-L-Lysin (o,□) bzw. Poly-L-Lysin x HBr (●,■). Die Salinekontrollwerte wurden jeweils abgezogen. Verwendet wurden folgende Seren: A) I Ae (o,●) und II Ae (□,■); B) III Ae (o,●) und IV Ae (□,■); C) V Ae (o,●); D) VI Ae (o,●).

Um die starke Reaktion von Anti-OmpA-Serum mit Aerobactin-Poly-L-Lysin besser charakterisieren zu können, wurden die Reaktionen von O Ae-, I Ae- und Anti-OmpA-Serum mit OmpA als Antigen (10 µg/ml) im ELISA getestet. O Ae ergab keine Reaktion. Die Reaktion im ELISA war mit I Ae in der Verdünnung 1:1000 halb so stark bei OmpA (Beschichtung mit 10 µg/ml) wie bei Aerobactin-Poly-L-Lysin (Beschichtung mit 100 µg/ml). Das läßt auf Kreuzreaktion schließen. Die starke Reaktion des Anti-OmpA-Serums mit Aerobactin-Poly-L-Lysin ließe sich mit dem hohen Anti-OmpA Antikörpergehalt des Anti-OmpA-Serums erklären.

Überraschend war die starke Bindung des I DHB-Serums an Aerobactin-Poly-L-Lysin im Gegensatz zur Bindung an DHB-Poly-L-Lysin. II DHB hingegen war in seiner Bindungsfähigkeit an Aerobactin-Poly-L-Lysin im Vergleich zu I DHB wieder sehr niedrig (siehe Tabelle 6).

Einfluß von Aerobactin, Mono- und Dilysin auf Bindung von I Ae und II Ae an Poly-L-Lysin und Aerobactin-Poly-L-Lysin im ELISA

Die Seren I Ae und II Ae wurden mit BSA/TRIS 1:1000 verdünnt und zu je 1,2 ml 100 µl einer 15 mM, 1,5 mM, 150 µM und 15 µM Lösung an Aerobactin (Molekulargewicht von 672 g/Mol wurde zugrunde gelegt), bzw. an Lysinmonohydrochlorid (347 g/Mol) wurden 7,5 mM, 750 µM, 75 µM und 7,5 µM Lösungen eingesetzt. Die Mischungen wurden dann eine halbe Stunde bei 37°C im Wasserbad geschwenkt (Gyrotory Waterbath Shaker Modell G75, New Brynswick Scientific), um die Komplexbildung zwischen Antikörper und Aerobactin bzw. Mono- oder Dilysinhydrochlorid zu gestatten. Die Lösungen wurden daraufhin im ELISA eingesetzt.

Durch Aerobactin wird die Endextinktion erniedrigt, bei I Ae deutlicher als bei II Ae (siehe Tabelle 7). Da aber die Bindung an Poly-L-Lysin gleich stark beeinflußt wird wie die Bindung an Aerobactin-Poly-L-Lysin, bleibt die Differenz zwischen diesen beiden Extinktionswerten, die als Aerobactin-bedingte Bindung interpretiert wurde, konstant.

Tabelle 7: Extinktionsdifferenz im ELISA mit Saline, Poly-L-Lysin und Aerobactin-Poly-L-Lysin als Antigen in Gegenwart von Aerobactin bzw. Dilysinhydrochlorid. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

Konzentration im Ansatz (µM)	ΔE_{405} Poly-L-Lysin[1)]	ΔE_{405} Aerobactin[2)]	
Aerobactin			
0	0,409	0,984	
1,2	0,389	1,035	
12	0,377	1,036	I Ae
120	0,308	1,055	
1200	0,118	1,032	
0	0,138	0,509	
1,2	0,096	0,542	
12	0,132	0,502	II Ae
120	0,117	0,515	
1200	0,048	0,490	
Dilysinhydrochlorid			
0	0,197	0,143	
1,2	0,184	0,163	
12	0,157	0,170	II Ae
120	0,153	0,162	
1200	0,145	0,154	

1) Extinktionsunterschied zwischen Poly-L-Lysin und Saline

2) Extinktionsunterschied zwischen Aerobactin-Poly-L-Lysin und Poly-L-Lysin

Mit Monolysinhydrochlorid konnte der Test nicht beeinflußt werden. Dilysinhydrochlorid zeigte nur einen geringen Einfluß auf die Bindung an Poly-L-Lysin, was aber nur mit II Ae ersichtlich wurde.

Diese Ergebnisse wären erklärbar, wenn man annimmt, daß die Bindungsstelle der Antikörper Strukturmerkmale sowohl von Aerobactin als auch von Poly-L-Lysin erkennt. Die Bindung an Poly-L-Lysin ist daher schwächer als an Aerobactin-Poly-L-Lysin. Blockiert Aerobactin die Bindungsstelle, wird die Bindung an Poly-L-Lysin und Aerobactin-Poly-L-Lysin in gleichem Maße behindert. Mono- und Dilysin binden vermutlich zu schwach, um einen Effekt zu zeigen.

Anreicherung der Bindungsfähigkeit durch Fraktionierung der Antikörper

Durch die Fällungsreaktion aus dem Serum mit Natriumsulfat erhält man nach Dialyse mit EDTA/M9-Salz-Lösung und mit M9-Salz-Lösung (siehe Methoden 2.2.8.) eine Antikörperlösung, die doppelt bis dreifach so stark an Aerobactin-Poly-L-Lysin bindet wie das Ausgangsserum. Das bedeutet, daß man in etwa die gleichen Extinktionswerte erhält, wenn man das Serum 1:1000 und die Antikörperlösung 1:2000 verdünnt. Die Proteinkonzentrationen der Antikörperlösungen liegen zwischen 10 und 15 mg/ml.

3.2.4. Wachstum des Stammes H646 unter dem Einfluß von Eisenmangel in Gegenwart von Antikörpern

Aus O DHB und II Ae-Serum wurden Antikörper fraktioniert (siehe Methoden 2.2.8.). Sie wurden gegen 10 mM EDTA/M9-Salzlösung dialysiert, um den Eisengehalt möglichst stark zu erniedrigen. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt. Der verwendete Stamm H646 ist nicht mehr in der Lage, Enterochelin zu produzieren. Er trägt aber das Col V-Plasmid K311, ist also fähig, unter Eisenmangel Aerobactin zu synthetisieren und sich so mit Eisen zu versorgen.

Es sollte geprüft werden, ob die Antikörper gegen Aerobactin-Poly-L-Lysin Aerobactin wegfangen können und damit das

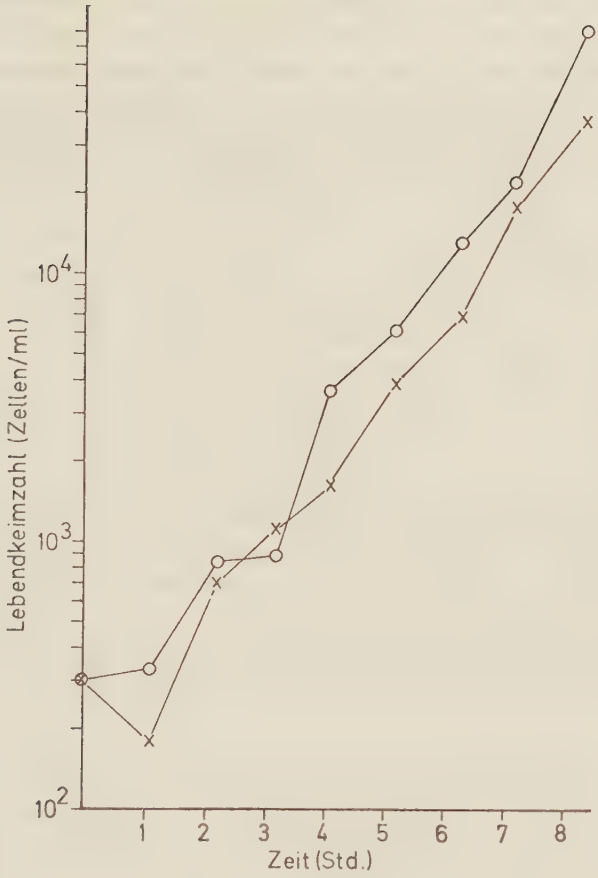


Abb. 15: Wachstum des E.coli K-12-Stammes H646 unter dem Einfluß von Eisenmangel in Gegenwart von Antikörpern (5 mg/ml M9-Medium, eisenextrahiert). (o) Antikörper gewonnen aus dem II Ae-Serum; (x) Antikörper gewonnen aus dem O DHB-Serum.

Wachstum verzögern. Um dies sichtbar zu machen, wurde eine geringe Zellzahl (etwa 300 Zellen/ml Kulturansatz) und eine große Proteinmenge (etwa 5 mg/ml) eingesetzt, da Bakterien unter Eisenmangel große Mengen an Eisenchelator produzieren können.

Vergleicht man die Wachstumskurven, die man erhält, wenn Antikörper aus dem O DHB-Serum eingesetzt wurden, mit dem Ansatz, in dem Antikörper aus dem II Ae-Serum verwendet wurden, so sieht man keinen Unterschied. Das kann daran liegen, daß die Bakterien zu viel Chelator produzieren, oder daran, daß die Antikörperaktivität zu gering ist.

4. DISKUSSION

Die Aufnahme der aktiven Enterochelin-Analogen erfolgt nicht unabhängig vom Enterochelin-Transportweg. Auf die Enterochelin-Rezeptor-Funktion (FepA) kann jedoch verzichtet werden (siehe Tabelle 3). Dies steht im Widerspruch zu dem Ergebnis von M.C. Venuti et al., das besagt, daß eine Mutante im Rezeptor-Protein FepA nicht mit FeMECAM als Eisenlieferant wachsen kann (74). In der hier verwendeten fepA-Mutante fehlt das FepA-Protein ganz. Es ist also auszuschließen, daß der FepA-Rezeptor so verändert ist, daß er Enterochelin nicht mehr, aber noch weiterhin die Enterochelin-Analogen erkennt und in der Membran weitergibt. Ist die FepA-Funktion vorhanden, kann jedoch eine Bindung von FeMECAM nachgewiesen werden. FeMECAM ist Enterochelin am ähnlichsten. Alle anderen geprüften Analogen können die Colicin B-Wirkung nicht verhindern (siehe 3.1.3.). Der Durchtritt der aktiven Modellsubstanzen durch die äußere Membran scheint erst durch Mutation mehrerer Eisenchelator-Rezeptor-Proteine erschwert zu sein.

Auf dem weiteren Weg ins Zellinnere kann jedoch nicht auf die tonB- und fepB-Gen-Produkte verzichtet werden. Dies spricht für die Beteiligung beider Gen-Produkte an dem Transport der aktiven Modellsubstanzen durch die Cytoplasmamembran. Da FepB bei der Aufnahme der Modellsubstanzen unabdingbar nötig ist, jedoch recht unterschiedliche Chelator-Strukturen akzeptiert, kann angenommen werden, daß für die Erkennung die unmittelbare Umgebung des Eisenions ausschlaggebend ist. Die aktiven Modellsubstanzen unterscheiden sich in diesem Bereich nicht. Daß nur FeMECAM spezifisch an das FepA-Protein bindet, deutet darauf hin, daß dieses Protein darüber hinaus weitere für Enterochelin charakteristische Strukturen erkennt. Die Sulfonierung von MECAM, Me_3MECAM und TRIMCAM scheint die Elektronenverteilung und Spannung im Molekül so stark zu verändern, daß diese Substanzen,

falls sie durch die äußere Membran gelangen, nicht mehr von FepB akzeptiert werden können. 3,4-LICAMS scheint diesen Anforderungen jedoch noch zu genügen.

Da das cytoplasmatische Enzym Enterochelinesterase bei der Verwendung der Enterochelin-Analogen notwendig ist, muß angenommen werden, daß die aktiven Modellsubstanzen tatsächlich ins Zellinnere gelangen. Die Abhängigkeit von der Enterochelinesterase ist sehr erstaunlich, da die Enterochelin-Analogen keine Esterbindungen besitzen. Es gibt widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des bevorzugten Substrats der Enterochelinesterase. Die einen (49,58) besagen, daß das Enzym aus zwei Polypeptidketten besteht und bevorzugt Eisen-Enterochelin spaltet. Die Mutanten tragen die Mutation im fesB-Gen, der kleineren Polypeptidkette (49). Andererseits wird berichtet, daß die kleinere Polypeptidkette alleine Esterase-Aktivität besitzt und eisenfreies Enterochelin schneller spaltet als die eisenhaltige Form (22). Es wurde angenommen, daß Enterochelin von den Reduktionsmitteln der Bakterienzelle nicht reduziert werden kann und deshalb vor der Reduktion gespalten wird. Man hat jedoch in Bacillus subtilis (grampositiv) eine Eisensiderophor-Reduktase gefunden, die aus Me_3MECAMS und MECAM Eisen durch Reduktion freisetzt, verstärkt in Anwesenheit von Flavinmononukleotid und Magnesiumchlorid, und damit den Bakterien Wachstum gestattet (50). Dabei ist davon auszugehen, daß diese Chelatoren mit Enterochelin vergleichbare Reduktionspotentiale besitzen (60). Auch ist bei der Eisenfreisetzung keine Spaltung nötig. In der cytoplasmatischen Fraktion des gramnegativen Agrobacterium tumefaciens konnte ebenfalls Eisensiderophor-Reduktase-Aktivität in Gegenwart von Flavinmononukleotid und Magnesiumchlorid gefunden werden, die FeEnterochelin, FeMECAM, FeMECAMS, Fe3,4-LICAMS und FeDiisp-3,4-LICAM reduzieren kann (51). Für die Möglichkeit der Eisenfreisetzung ohne Spaltung der Chelatoren auch bei Escherichia coli spricht die Verwendbarkeit von Me_3MECAM, dessen Amidfunktionen durch Methylgruppen blockiert sind. Wenn man annimmt, daß die Enterochelinesterase alleine oder in Ver-

bindung mit einem weiteren Enzym Enterochelin während oder vor der Spaltung reduziert, könnte erklärt werden, warum die Verwertung der Enterochelinanalogen trotzdem von der Enterochelinesterase abhängig ist.

Vergleicht man die Ergebnisse des Plattentests mit denen des Eisentransportes, so zeigt sich, daß der Plattentest sehr empfindlich ist. Man sieht mit den Modellsubstanzen Me_3MECAM, 3,4-LICAMS und Diisp-3,4-LICAM noch ein Wachstum des Stammes AB2847 auf der Platte. Mit dem Eisentransportansatz konnte jedoch kein Transport nachgewiesen werden (siehe Abb. 8B).

Ausgehend von den Ergebnissen, dargestellt in Tabelle 3, wäre die Verwendung von 3,4-LICAMC und der sulfonierten Derivate MECAMS, Me_3MECAMS und TRIMCAMS zur Behandlung von Eisenüberladung zu empfehlen. Sie fördern das Wachstum der E. coli-Stämme AB2847 und AN92, die intakte Eisentransportsysteme besitzen, nicht. Sie sind besser wasserlöslich als Enterochelin bzw. MECAM und weniger oxidationsempfindlich. Für Me_3MECAMS und 3,4-LICAMC wurde bereits die Fähigkeit nachgewiesen, Eisen von Transferrin abzuziehen (siehe Tabelle 2).

Experimente mit hypertransfundierten Ratten zeigten, daß sulfonierte Catechoylamide Eisen auch in vivo mobilisieren können. Diese Substanzen waren nicht akut toxisch, führten aber nach einigen Tagen infolge von Bakteriämie zum Tode der Tiere (60). Da die Verwendung von Me_3MECAMS durch Bacillus subtilis (50) nachgewiesen wurde, müßte man vor der Anwendung von Eisenkomplexbildnern systematisch ihre Verwertbarkeit durch eine repräsentative Auswahl von Krankheitserregern untersuchen.

Betrachtet man die Immunantwort auf das Antigen DHB-Poly-L-Lysin, so zeigt sich, daß dieses Antigen die Menge der Antikörper, die mit DHB-Poly-L-Lysin reagieren, nicht erhöht (siehe Tabelle 5). Dies läßt sich im ELISA deutlicher nachweisen als mit der Immundiffusion nach Ouchterlony. Da auch in den Vergleichsseren Antikörper vorhanden sind, die mit

DHB-Poly-L-Lysin kreuzreagieren, muß man annehmen, daß die Kaninchen bereits mit Enterochelin-produzierenden Bakterien in Berührung kamen. Dabei ist davon auszugehen, daß Enterochelin für sich zu klein ist, eine Immunantwort hervorzurufen. Es wird vielleicht durch die Verbindung mit einem größeren Molekül, z.B. seinem Rezeptor-Protein in der Bakterienzellwand immunogen.

Vergleicht man die Ergebnisse, die man mit dem I Ae-Serum im ELISA und im Immundiffusionstest erhält, so kann man folgern, daß der ELISA sehr viel empfindlicher ist als der Test nach Ouchterlony. Im Ouchterlony-Test ließen sich die Antikörper, die mit Aerobactin-Poly-L-Lysin reagieren, nicht nachweisen. Im Gegensatz dazu führten sie im ELISA zu einer starken Reaktion. Als weiteren Vorteil benötigt man viel weniger Antigen und Serum, um den ELISA durchzuführen. Auch können Seren bezüglich ihres Antikörpergehalts quantitativ verglichen werden. Dadurch konnte man feststellen, daß das mit Aerobactin-Poly-L-Lysin immunisierte Kaninchen durch wiederholte Immunisierung eine Toleranz gegen dieses Antigen entwickelte (siehe Tabelle 6, Abb. 14).

Ausbleibende Immunantwort und Toleranzentwicklung stehen in engem Zusammenhang zu der Immunogenität von Antigenen (2, Kapitel 2). Man kann zwei Klassen von Antigenen unterscheiden. Thymusunabhängige Antigene rufen eine Antikörperproduktion ohne die Anwesenheit von T-Zellen hervor. Dazu zählt man z.B. Lipopolysaccharid und zahlreiche Kohlenhydrate, bei denen sich die antigene Determinante regelmäßig wiederholt. Thymusabhängige Antigene benötigen spezifische T-Helfer-Zellen, um die B-Zellen zur Antikörperproduktion anzuregen. Dazu gehören die meisten Proteine.

Verwendet man trägergebundene Haptene als Antigen, wirken zwei getrennte Erkennungsprozesse für Hapten und Träger zusammen. T-Zellen erkennen Determinanten des Trägermaterials und wirken stimulierend auf B-Zellen ein, die dann Antikörper gegen das Hapten produzieren (2, Kapitel 8). B-Zellen erkennen also die Haptene als Determinante, wobei diese

nicht kovalent an das Trägermolekül gebunden sein müssen. Für die Immunogenität eines Haptens ist hauptsächlich das Trägermaterial verantwortlich, d.h. es kann eine Antikörper-Produktion gegen das Träger-gebundene Hapten nur in Gang kommen, wenn der Träger als Immunogen erkannt werden kann, also die Fähigkeit existiert, spezifische T-Helfer-Zell-Aktivität auszubilden.

Da synthetische Homopolymere, bestehend aus L-Aminosäuren, nur eine sehr begrenzte Anzahl an verschiedenen Determinanten besitzen und da die Fähigkeit, Determinanten zu erkennen, genetisch festgelegt ist (2, Kapitel 10), können verschiedene Einzeltiere unterschiedlich stark auf ein solches Hapten-tragendes Homopolymer reagieren. Das Ausbleiben der Immunantwort auf DHB-Poly-L-Lysin könnte eventuell damit erklärt werden, daß das mit DHB-Poly-L-Lysin immunisierte Kaninchen die für das Poly-L-Lysin charakteristischen Determinanten nicht erkennen konnte.

Die Toleranzentwicklung des mit Aerobactin-Poly-L-Lysin immunisierten Kaninchen bestätigt, daß Poly-L-Lysin nur gering immunogen ist. Allgemein gilt, daß Toleranz gegen schwach immunogene Antigene leicht erzeugt werden kann. Ob eine Immunantwort oder eine Toleranz hervorgerufen wird, hängt sehr stark von der verwendeten Antigendosis ab. Zu Beginn (siehe Tabelle 4)war die Antigendosis klein genug, um zur gewünschten Immunantwort zu führen. Die späteren Antigendosen waren zu hoch, so daß sich Toleranz entwickeln konnte. Da der zeitliche Abstand von 78 Tagen zwischen den Antigengaben zur Gewinnung von II Ae und III Ae (siehe Tabelle 4) nicht ausreichte, die Toleranz abklingen zu lassen, lag eine Toleranz auf der T-Zell-Ebene vor. Toleranz auf der T-Zell-Ebene dauert etwa 100 Tage an, die auf B-Zell-Ebene jedoch nur etwa 50 Tage (2, Kapitel 9). Die folgenden Immunisierungen und die Verwendung von Aluminiumhydroxyl-γ-Gel bewirkten, daß das Antigen im Körper anwesend blieb und so ein Verschwinden der Toleranz verhindert wurde.

Abschließend muß also festgestellt werden, daß Poly-L-Lysin als Trägermaterial wegen seiner geringen Immunogenität ungeeignet ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Synthetische Enterochelin-Analoge wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Escherichia coli K-12-Stämme unter Eisenmangel im Wachstum zu fördern. Die zyklischen Substanzen MECAM (1,3,5-N,N',N''-tris-(2,3-Dihydroxybenzoyl)-Triaminomethylbenzol), Me_3MECAM (an den Amidbindungen methyliertes MECAM) und TRIMCAM (1,3,5-tris-(2,3-Dihydroxybenzoylcarbamido)-Benzol waren aktiv. Die an den 2,3-Dihydroxybenzoesäure-Ringen in 5-Stellung sulfonierten Derivate waren inaktiv. Die lineare, sulfonierte Substanz 3,4-LICAMS (1,5,10-N,N',N',N''-tris-(5-sulfo-2,3-Dihydroxybenzoyl)-Triazadecan) fördert jedoch das Wachstum. Im Gegensatz dazu war 3,4-LICAMC (1,5,10-N,N',N''-tris-(2,3-Dihydroxy-4-Carboxybenzoyl)-Triazadecan), das in 4-Stellung Carboxyl-Gruppen trägt, inaktiv.

Stämme, die in der Fähigkeit, Eisen-Enterochelin, Eisen-Citrat und Ferrichrom als Eisenlieferanten zu verwenden, mutiert waren, wurden benutzt, um den Aufnahmeweg der Eisen-Enterochelin-Analogen zu verfolgen. Die aktiven Substanzen benötigen intakte fepB-, fesB- und tonB-Funktionen. Auf das Enterochelin-Rezeptor-Protein FepA in der äußeren Membran kann verzichtet werden. Nur FeMECAM schützt die Zelle vor Colicin B, das über den Enterochelin-Rezeptor eindringt, und transportiert Fe^{3+} in ähnlichen Raten wie Enterochelin.

Aerobactin und DHB (2,3-Dihydroxybenzoesäure) wurden mit Hilfe von Carbodiimid an Poly-L-Lysin gekuppelt und als Antigen verwendet. Bei der Untersuchung der gewonnenen Seren mittels ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) zeigte sich, daß DHB-Poly-L-Lysin zu keiner Immunantwort und Aerobactin-Poly-L-Lysin bei wiederholter Immunisierung zu Toleranz führte. Der Träger Poly-L-Lysin ist wahrscheinlich zu schwach immunogen, um den Antikörpertiter gegen die Haptene in gewünschtem Maße zu erhöhen. So war es nicht möglich festzustellen, ob durch trägergebundenes DHB bzw. Aerobactin

Antikörper hervorgerufen werden können, die durch Abfangen von Enterochelin bzw. Aerobactin die Bakterien unter Eisenmangel am Wachstum hindern können.

6. LITERATUR

1. Addy, M.E., Steinman, G., Malkette, F. (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 385-395

2. Benecerraf, B., Unanue, E.R. (1982) "Immunologie" Walter de Gruyter; Berlin; New York

3. Bindereif, A., Braun, V., Hantke, K. (1982) J. Bact. 150, 1472-1475

4. Birosel, D.M. (1930) J. Am. Chem. Soc. 52, 1944-1948

5. Böhlen, P., Stein, S., Daiman, W., Idenfriend, S. (1973) Arch. Biochim. Biophys. 155, 213-220

6. Braun, V. Forum Mikrobiologie 2/1981, 69-72

7. Braun, V. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 11, 225-228

8. Braun, V., Burkhardt, R. (1982) J. Bact. 152, 223-231

9. Braun, V., Burkhardt, R., Schneider, R., Zimmermann, L. (1982) J. Bact. 151, 553-559

10. Braun, V., Frenz, J., Hantke, K., Schaller, K. (1980) J. Bact. 142, 162-168

11. Braun, V., Hantke, K. (1981)in B.K. Ghosh (ed.) "Organization of procaryotic cell membranes", Vol. II, pp 1-73, CRC Press, Boca Raton, Florida

12. Braun, V., Hantke, K. (1982) in Martonosi (ed.) "Membranes and Transport", Vol. II, pp 107-113; Plenum Publishing Press, New York

13. Braun, V., Schaller, K., Wolff, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 323, 87-97

14. Castell, J.V., Cervera, M., Marco, R. (1979) Anal. Biochem. 99, 379-391

15. Elwell, L.P., Shipley, P.L. (1980) Ann. Rev. Microbiol. 34, 465-496

16. Engvall, E. (1980) Methods in Enzymology 70, 419-439

17. Finkelstein, R.A., Yancey, R.J. (1981) Infect. Immun. 32, 609-613

18. Fitzgerald, S.P., Rogers, H.J. (1980) Infect. Immun. 27, 302-308

19. Frost, G., Rosenberg, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 330, 90-101

20. Funakoshi, S., Doi, T., Nakajima, T., Suyama, T., Tokuda, M. (1982) Microbiol. Immunol. 26, 227-239

21. Garibaldi, J.A. (1972) J. Bact. 110, 262-265

22. Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1978) Biochim. Biophys. Acta 525, 209-218

23. Grewal, K.K., Warner, P.J., Williams, P.H. (1982) FEBS Lett. 140, 27-30

24. Griffiths, E., Rogers, H.J., Bullen, J.J. (1980) Nature 284, 508-509

25. Guterman, S.K. (1971) Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 1149-1155

26. Guterman, S.K. (1973) J. Bact. 114, 1217-1224

27. Hancock, R.E.W., Hantke, K., Braun, V. (1976) J. Bact. 127, 1370-1375

28. Hancock, R.E.W., Braun, V. (1976) J. Bact. 125, 409-415

29. Hancock, R.E.W., Hantke, K., Braun, V. (1977) Arch. Microbiol. 114, 231-239

30. Hantke, K. (1982) FEMS Microbiol. Lett. 15, 83-86

31. Hantke, K. (1981) Mol. Gen. Genet. 182, 288-292

32. Hantke, K., Braun, V. (1975) FEBS Lett. 59, 277-281

33. Hantke, K., Braun, V. (1975) FEBS Lett. 49, 301-305

34. Hantke, K., Braun, V. (1978) J. Bact. 135, 190-197

35. Hantke, K., Zimmermann, L. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 12, 31-35

36. Harris, W.R., Carrano, C.J., Cooper, S.R., Sofen, S.R., Avdeef, A.E., Mc Ardle, J.V., Raymond, K.N. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 6097-6104

37. Harris, W.R., Carrano, C.J., Raymond, K.N. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 2722-2727

38. Harris, W.R., Raymond, K.N., Weitl, F.L. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 2667-2675

39. Harris, W.R., Weitl. F.L., Raymond, K.N. (1979) J.C.S. Chem. Comm., 177-178

40. Hartmann, A., Braun, V. (1980) J. Bact. 143, 246-255

41. Hartmann, A., Fiedler, H.-P., Braun, V. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 517-524

41a. Heidinger, S., Braun, V., Pecoraro, V.L., Raymond, K.N. (1983) J. Bact. (im Druck)

42. Hollifield, W.C., Neilands, J.B. (1978) Biochem. 17, 1922-1928

43. Hussein, S., Hantke, K., Braun, V. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 431-437

44. Ichihara, S., Mizushima, S. (1978) J. Biochem. 83, 137-140

45. Kadner, R.J., Heller, K., Coulton, J.W., Braun, V. (1980) J. Bact. 143, 256-264

46. Kadner, R.J., McElhaney, G. (1978) J. Bact. 134, 1020-1029

47. Kluger, M.J., Rothenburg, B.A. (1979) Science 203, 374-376

48. Konisky, J. (1979) in M. Inoye (ed.) "Bacterial outer membranes: biogenesis and function", pp 319-359, John Wiley & Sons, Inc., New York

49. Langmann, L., Young, I.G., Frost, G.E., Rosenberg, H., Gibson, F. (1972) J. Bact. 112, 1142-1149

50. Lodge, J.S., Gaines, C.G., Arceneaux, J.E.L., Byers, B.R. (1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 97, 1291-1295

51. Lodge, J.S., Gaines, C.G., Arceneaux, J.E.L., Byers, B.R. (1982) J. Bact. 149, 771-774

52. McIntosh, M.A., Chenault, S.S., Earhart, C.F. (1979) J. Bact. 137, 653-657

53. McNabb, P.C., Tomasi, T.B. (1981) Ann. Rev. Microbiol. 35, 477-496

54. Moore, D.G., Earhart, C.F. (1981)Infect. Immun. 31, 631-635

55. Moore, D.G., Yancey, R.J., Lankford, C.E., Earhart, C.F. (1980) Infect. Immun. 27, 418-423

56. Neilands, J.B. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 715-731

57. Neilands, J.B., Erickson, T.J., Rastetter, W.H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3831-3832

58. O'Brien, I.G., Cox, G.B., Gibson, F. (1971) Biochim. Biophys. Acta 237, 537-549

59. Ouchterlony, O. (1968) Handbook of Immundiffusion and Immunoelectrophoresis, Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor (Mich)

60. Pecoraro, V.L., Weitl, F.L., Raymond, K.N. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 5133-5140

61. Pugsley, A.P., Reeves, P. (1976) J. Bact. 126, 1052-1062

62. Pugsley, A.P., Reeves, P. (1976) J. Bact. 127, 218-228

63. Raymond, K.N., Carrano, C.J. (1979) Acc. Chem. Res. 12, 183-190

64. Reynolds, P.R., Mottur, G.P., Bradbeer, C. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4313-4319

65. Rogers, H.J. (1974) in D. Schlessinger (ed.) "Microbiology", pp 289-298, Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.

66. Rosenberg, H., Young, I.G. (1974) in J.B. Neilands (ed.) "Microbial iron metabolism", pp 67-82, New York: Academic Press

67. Sawatzki, G., unveröffentlichte Ergebnisse

68. Schneider, R., Hartmann, A., Braun, V. (1981) FEMS Lett. 11, 115-119

69. Sheehan, J.C., Hess, G.P. (1955) J. Am. Soc. 77, 1067-1068

70. Stanier, R.Y., Adelberg, E.A., Ingraham, J.L. (1977) "General Microbiology", pp 785-809, Macmillan Press LTD London and Basingstoke

71. Stuart, S.J., Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1980) J. Bact. 143, 35-42

72. Von Arx, E., Faupel, M., Brugger, M. (1976) J. Chromatogr. 120, 224-228

73. Van Tiel-Menkveld, G.J., Mentjox-Vervuurt, J.M., Oudega, B., De Graaf, F.K. (1981)J. Bact. 150, 490-497

74. Venuti, M.C., Rastetter, W.H., Neilands, J.B. (1979) J. Med. Chem. 22, 123-124

75. Voller, A., Bidwell, D., Bartlett, A. (1976) in Rose, N.R., Friedman, H. (eds.) "Manual of Clinical Immunology", pp 506-512, Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.

76. Wagegg, W., Braun, V. (1981) J. Bact. 145, 156-163

77. Warner, P.J., Williams, P.H., Bindereif, A., Neilands, J.B. (1981) Infect. Immun. 33, 540-545

78. Wayne, R., Neilands, J.B. (1975) J. Bact. 121, 497-503

79. Weaver, C.A., Konisky, J. (1980) J. Bact. 143, 1513-1518

80. Weinberg, E.D. (1974) Science 184, 952-956

81. Weinberg, E.D. (1978) Microbiol. Rev. 42, 45-66

82. Weitl, F.L., Harris, W.R., Raymond, K.N. (1979) J. Med. Chem. 22, 1281-1283

83. Weitl, F.L., Raymond, K.N. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 2728-2731

84. Weitl, F.L., Raymond, K.N. (1981) J. Org. Chem. 46, 5234-5237

85. Weitl, F.L., Raymond, K.N., Durbin, P.W. (1981) J. Med. Chem. 24, 203-206

86. Williams, D.H., Fleming, J. (1975) "Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung", Georg Thieme Verlag, Stuttgart

87. Williams, P.H. (1979) Infect. Immun. 26, 925-932

88. Williams, P.H., Warner, P.J. (1980) Infect. Immun. 29, 411-416

89. Woodrow, G.C., Langmann, L., Young, I.G., Gibson, F. (1978) J. Bact. 133, 1524-1526

90. Wookey, P. (1982) FEBS Lett. 139, 145-154

91. Wookey, P., Hussein, S., Braun, V. (1981) J. Bact. 146, 1158-1161

92. Wookey, P., Rosenberg, H. (1978) J. Bact. 133, 661-666

93. Yancey, R.J., Breeding, S.A.L., Lankford, C.E. (1979) Infect. Immun. 24, 174-180

Lebenslauf

12.7.1954	in Karlsruhe geboren
1961 - 1965	Grundschule in Buchen im Odenwald
1965 - 1970	Burghardt-Gymnasium in Buchen
1970 - 1973	Dillmann-Gymnasium in Stuttgart
7.6.1973	Abitur
WS 1973/74	Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
ab SS 1974	Studium der Biochemie in Tübingen
4.4.1975	erster Teil des Vordiploms in Biochemie
26.3.1976	zweiter Teil des Vordiploms
Nov. 1978	mündliche Diplomhauptprüfung
WS 1978/79 bis WS 1979/80	Anfertigung der Diplomarbeit "In vivo Lipidperoxidation in der Maus unter dem Einfluß von Superoxid-Dismutase-aktiven Kupferkomplexen"
April 1980 bis Februar 1983	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl der Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun

Meine akademischen Lehrer waren:

V. Braun, E. Bayer, H. Bisswanger, E. Betz, F. Gönnenwein, K. Grell, J. Guglielmi, H. Hagenmaier, M. Hanak, E. Müller, K. Mörike, D. Mecke, H. Mauser, H. Probst, W. Rüdorff, H. Remmer, W. Voelter, A. Wendel, H. Wolf, U. Weser, G. Weitzel, W. Zeil, H. Zähner

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/64321